



Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)
Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER, ISCIII)
Universidad Autónoma de Madrid

REPRESIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN MITOCONDRIAL EN PROGRESIÓN TUMORAL Y EN SENESCENCIA

Memoria presentada por la licenciada
María Sánchez Aragón
para optar al grado de
Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. José Manuel Cuezva Marcos**
Madrid, 2009

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Enero 2005-Junio 2009). Durante este periodo, la licenciada María Sánchez Aragón ha disfrutado de una Beca predoctoral del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo (Enero 2005-Diciembre 2007), asociada al proyecto de investigación PI041255 y de un contrato de investigador (Enero 2008-Junio 2009) del CIBERER (Instituto de Salud Carlos III).

A mi madre
A mis hermanas

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el
vapor, la electricidad y la energía atómica:
la voluntad”*

Albert Einstein.

Agradecimientos

Han sido años llenos de alegrías, disgustos, risas, lágrimas, experiencias y sensaciones que no olvidaré nunca, pero sobre todo, me he sentido rodeada de personas con las que me enorgullece haber compartido todos esos momentos y por lo que me resulta especialmente emotivo escribir estas líneas. Espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar, quiero dar las gracias de corazón a mi director de tesis, Pepe Cuezva, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender con él. Gracias por tus aportaciones y discusiones científicas que tanto me han enseñado, y sobre todo, por tu confianza en mí y tu ayuda.

Al Dr. Fernando López-Ríos y al resto del equipo del Hospital Doce de Octubre de Madrid por los estudios de inmunohistoquímica y FDG-PET en las muestras de carcinomas de pulmón. Al Dr. J. Montoya y a M^a Dolores Herrera de la Universidad de Zaragoza por los datos de mtDNA. A la Dra. E. Guillou por los estudios de dimerización.

A todo el personal de los servicios del CBM que han contribuido directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. Especialmente quiero destacar a Maite Rejas y a Milagros del S^o de Microscopía Electrónica, por su gran ayuda y buena disposición. A Fernando Carrasco y Aitor Sánchez del S^o de Genómica, por su gran profesionalidad y rigor científico. A Javier Palacín y Miguel Ángel Bordallo del Animalario, por sus consejos y colaboración. A Juan Rebellés del S^o de Cultivos, por su enorme ayuda. A Santi del S^o de Informática por su infinita paciencia con mis “problemas digitales”.

A todos los que formasteis parte de la época del CX-101, algo irrepetible: Marta, por haber guiado mis primeros pasos en el mundo de la investigación y sobre todo, por seguir ahí apoyándome día a día, Antonio, por hacerme reír hasta llorar, a mi querida “Posdot”, Paloma, por ser un ejemplo de fuerza y superación, a Gema, por ser la voz de la experiencia, al hombre de la capucha negra, Dani, por sus visitas a media tarde con risas descontroladas, a Sandra Sala, por traer su alegría al laboratorio cada mañana, a la pequeña Inés, por su dulzura y sus bizcochos... No quiero olvidarme de otras personas que pasaron por el CX y con las que también compartí muy buenos momentos, Pablo, Amaya, Piedad, Edgar y Paula.

A mis compañeros del 326 por el día a día. Álvaro, por ser una referencia profesional, por tu complicidad y por no dejarme nunca perder el norte, a mis “hermanas pequeñas” Laura e Imke, por vuestra alegría y amistad, a la “prima” Cris por confiarme sus historias e inquietudes, a mi tocaya María Morán, por entenderme tan bien, a Marcos, por darme siempre una visión transparente de la realidad y por estar siempre dispuesto a ayudar (a pesar de desconectarme el cable de red frecuentemente), a Santi, nuestro inquilino favorito, por su contagioso entusiasmo, a Juanma Zapata, por sus críticas siempre constructivas, a todas las nuevas adquisiciones, sin duda grandes promesas, Inma, Marta, Laura Formentini y Fulvio, por sus ánimos. De forma muy especial quiero dar las gracias a Margarita, por cuidar de mí, por ser como

una madre durante estos años, y sobre todo, por su bondad y por querer de corazón que seamos felices. Sigo esperando con ansia tu cuento...

A mis compañeros y amigos del CBM: Elise, por tener siempre esa sonrisa y no haber dejado nunca de visitar a sus “rancios favoritos”, te echaremos mucho de menos, a Inma, por estar siempre dispuesta a darme un gran consejo, a Alanín, por su apoyo diario y su cariño. A Javi, Laura, Araceli, y Nacho, por vuestros ánimos y al resto del 321 por ser los mejores vecinos. A Helena del 327, por su amistad fuera y dentro del CBM. A Enrique Nuñez, por estar siempre dispuesto a darme su energía positiva, a Juan Rebélles y María Chorro, por dejarme aprender de ellos.

No puedo olvidarme de mis “chicos del gym”, Carlitos, Juanjo, Alberto, Gerardo, Miguel, Bea, Ana, Dani, y el resto del equipo, por tantas energéticas tardes y por “obligarme” a desconectar.

A mis amigas de siempre, por tener una paciencia infinita y por su incondicional apoyo y confianza: Blanca, por entenderme sin necesidad de palabras, Bárbara, por tu sinceridad, Virginia, por tus constantes ánimos desde cualquier ciudad de España y Mary por tu comprensión y tus consejos, gracias chicas. A mis niños, Juanjo, por escucharme, por hacerme ver siempre el lado positivo de la vida y por tantos buenos momentos, y Marquitos, por tu cariño y buen humor.

Gracias a mi madre, por ser mi ejemplo en la vida, por enseñarme a luchar, a ser mejor persona y por darme toda la dulzura y el amor del mundo. A mis hermanas, Andrea, por su apoyo desde el otro lado del “charco” y Rita, por ser la alegría de la casa, por su ternura y por toda una vida llena de recuerdos y buenos momentos. A las tres, por aguantarme estos últimos meses...

Abreviaturas

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana de la mitocondria
$\Delta\mu H^+$	Gradiente electroquímico de protones
AMP/ADP/ATP	Adenina 5' mono/di/trifosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
BEC	Índice Bioenergético Celular
BNPAGE	Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida
3-BrP	3-Bromo-piruvato
BSA	Albúmina de suero bovino
CCR	Carcinoma colorrectal
CDKs	Quinasas dependientes de ciclina
CKI	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CHC	Carcinoma hepatocelular
COX	Citocromo c oxidasa
DCA	Dicloroacetato
2-DG	2-desoxiglucosa
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
DTT	Ditiotreitol
ECAR	Acidificación del medio extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
^{18}F FDG	2-[^{18}F]-2-desoxi-fluoro-D-glucosa
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonil-ciadina-p-trifluorometoxifenil hidrazona
FDR	Test de corrección múltiple de Benjamini y Hochberg
5-FU	5-fluorouracilo
G	Línea celular tratada con oligomicina con fenotipo gluco- lítico
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HK	Hexokinasa
Hsp60	Proteína de choque térmico de 60KDa
IAA	Iodoacetato
IRES	Secuencia de iniciación interna de la traducción
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
M	Línea celular control con fenotipo mitocondrial
NAD ⁺ /NADH	Nicotidamida-adenina dinucleótido oxidado/reducido
NCI	Instituto Nacional del Cáncer

OCR	Tasa de consumo de oxígeno
OL	Oligomicina
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Tampón fosfato salino
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK-1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PET	Tomografía de emisión de positrones
PMSF	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PK	Piruvato quinasa
PPP	Vía de las pentosas fosfato
Rb	Retinoblastoma
mRNA	RNA mensajero
β -mRNA	RNA mensajero de la subunidad β -F1-ATPasa
rRNA	RNA ribosómico
tRNA	RNA de transferencia
RNABP	Proteína de unión a RNA
RSO	Respiración sensible a oligomicina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA- β -gal	Senescencia asociada a β -galactosidasa
SDS	Sodiododecilsulfato
S.E.M.	Error estándar de la media
SM	Línea celular tratada con 2-desoxiglucosa con fenotipo super mitocondrial
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
UTR	Región no traducida

ÍNDICE

SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. La mitocondria	7
1.1.1. Papel en la fisiología celular	7
1.1.2. Estructura y función de la H ⁺ -ATP sintasa mitocondrial	7
1.1.3. El cáncer y la mitocondria	9
1.2. El metabolismo energético de la célula tumoral	11
1.2.1. La glucólisis es el metabolismo energético de células proliferativas	11
1.2.2. La glucólisis aerobia controla la progresión del ciclo celular	13
1.2.3. Genes del cáncer y metabolismo glucolítico de los tumores	14
1.3. Traslación de la mitocondria al ámbito clínico	18
1.3.1. La <i>huella bioenergética</i> del cáncer	18
1.3.2. La <i>huella bioenergética</i> como marcador de prognosis	19
1.4. Metabolismo energético y muerte celular	20
1.4.1. La actividad mitocondrial es un supresor tumoral	21
1.4.2. El metabolismo energético como diana terapéutica	23
1.5. Senescencia y cáncer	27
1.5.1. Senescencia replicativa o dependiente de telómeros	28
1.5.2. Senescencia prematura o independiente de telómeros	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. MATERIALES	39
3.1.1. Líneas celulares humanas	39
3.1.2. Animales de experimentación	39
3.1.3. Oligonucleótidos	39
3.1.4. Otros compuestos	39
3.2. MÉTODOS	42
3.2.1. Tratamientos celulares	42
3.2.2. Técnicas de microscopía electrónica	42
3.2.2.1. Inclusión convencional en Epon	42
3.2.2.2. Criosustitución e inclusión en Lowicryl	42
3.2.2.3. Inmunomarcaje	43
3.2.2.4. Procesamiento y cuantificación de imágenes	43
3.2.3. Análisis metabólicos	43

3.2.3.1. Determinación del flujo glucolítico	43
3.2.3.2. Medida del consumo de oxígeno en células pegadas	44
3.2.3.3. Determinación del consumo de oxígeno en células en suspensión	44
3.2.4 Medida de la viabilidad celular	45
3.2.5. Estudios de citometría de flujo	46
3.2.5.1. Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio	46
3.2.5.2. Análisis de la muerte celular por tinción con AnexinaV-FITC	46
3.2.5.3. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno	47
3.2.5.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	47
3.2.6. Análisis de la muerte celular por microscopía de fluorescencia	47
3.2.7. Determinación de actividad β-galactosidasa	48
3.2.8. Extracción y cuantificación de proteínas	48
3.2.9. Fraccionamiento electroforético de proteínas y <i>Western blot</i>	48
3.2.9.1. Electroforesis de proteínas mono-dimensionales	48
3.2.9.2. Electroforesis de proteínas bi-dimensionales	48
3.2.9.3. Electroforesis Blue Native de complejos de membrana en condiciones nativas	49
3.2.9.4. Tinción de proteínas	50
3.2.9.5. <i>Western blot</i>	50
3.2.10. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares	52
3.2.11. Proliferación tumoral en ensayos con ratones desnudos “<i>nude</i>”	52
3.2.12. Tratamiento antitumoral de los animales	52
3.2.13. Análisis de la expresión génica por microarrays de DNA	53
3.2.13.1. Síntesis de cRNA biotinilado	53
3.2.13.2. Hibridación y escaneado del Human Genome U133Plus 2.0 array	53
3.2.13.3. Escalado y normalización de las matrices	54
3.2.13.4. Análisis bioinformático	54
3.2.14. Validación de los resultados de microarrays mediante qPCR a tiempo real	55
3.2.15. Análisis estadístico de los resultados	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Carcinoma colorrectal (CCR)	59
4.1.1. El fenotipo bioenergético de las líneas celulares HCT116	60
4.1.2. El fenotipo glucolítico favorece el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	64
4.1.3. La bioenergética celular condiciona la respuesta a muerte	66
4.1.4. Diferencias en el transcriptoma de células M y G	67
4.1.5. Las células G reprimen la expresión de la mayoría de los genes mitocon-	

	<i>Índice</i>
driales	71
4.1.6. El desarrollo tumoral requiere la selección de células con represión de la biogénesis mitocondrial (fenotipo G)	73
4.1.7. La adquisición del fenotipo G es reversible	76
4.1.8. El metabolismo energético aporta una diana para el tratamiento del cáncer	77
4.1.9. El DCA frena la proliferación celular y revierte el fenotipo glucolítico	80
4.2. Carcinoma hepatocelular humano (CHC)	82
4.2.1. El fenotipo bioenergético de la línea celular HepG2	82
4.2.2. La dimerización de la H ⁺ -ATP sintasa participa en la formación de crestas mitocondriales	85
4.2.3. El estrés mitocondrial frena el crecimiento de las células G	87
4.2.4. Caracterización del fenotipo senescente de células G	89
4.2.5. La vía de p16-Rb señala el fenotipo senescente de las células G	90
4.2.6. El fenotipo senescente confiere resistencia a la muerte celular por vía mitocondrial	93
4.3. Marcadores del metabolismo energético en el panel de líneas celulares tumorales del NCI-60 (National Cancer Institute)	94
4.3.1. Análisis del fenotipo bioenergético del panel del NCI-60	94
5. DISCUSIÓN	99
5.1. La progresión del cáncer colorrectal requiere la represión de la función bioenergética de la mitocondria	101
5.2. La disfunción de la mitocondria induce un fenotipo de senescencia prematura en células HepG2	110
5.3. El metabolismo energético aporta una característica fenotípica común a distintas neoplasias	114
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO I	163
ANEXO II	169

INTRODUCCIÓN

Figura I1. Estructura de la H ⁺ -ATP sintasa mitocondrial	8
Figura I2. Características fenotípicas de la célula tumoral	10
Figura I3. El fenotipo glucolítico de la célula proliferativa	12
Figura I4. Bases moleculares del cáncer	16
Figura I5. Metabolismo energético y muerte celular	23
Figura I6. Vías de señalización de senescencia celular	30

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. XF24 Seahorse Biosciences	45
---	----

RESULTADOS

Figura R1. Regulación de la huella bioenergética en células HCT116 derivadas de carcinoma colorrectal	60
Figura R2. Ultraestructura mitocondrial en células SM, M y G	61
Figura R3. Los cambios en el fenotipo bioenergético no afectan al número de orgánulos por célula	62
Figura R4. Caracterización del fenotipo metabólico en células HCT116 derivadas de carcinoma colorrectal	63
Figura R5. El fenotipo bioenergético no condiciona el ritmo de proliferación celular <i>in vitro</i>	64
Figura R6. El fenotipo glucolítico promueve el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	65
Figura R7. El fenotipo bioenergético correlaciona con la respuesta celular a muerte tras el tratamiento con 5-FU	67
Figura R8. Análisis de expresión génica de células HCT116	68
Figura R9. El análisis de la expresión génica revela la represión de la biogénesis mitocondrial en células G	71
Figura R10. El análisis por qPCR a tiempo real de algunos genes relevantes en cáncer y función mitocondrial confirma los resultados de expresión génica obtenidos en la micromatriz de DNA	73
Figura R11. Los tumores derivados de los tres fenotipos bioenergéticos de células HCT116 tienen la misma huella mitocondrial	74
Figura R12. El análisis por qPCR confirma la identidad de los tumores T-G y T-M	75
Figura R13. El fenotipo metabólico de la célula tumoral es una característica modulable	76
Figura R14. El metabolismo energético supone una diana efectiva para el tratamiento del cáncer	77
Figura R15. El fenotipo bioenergético de las células HCT116 condiciona su respuesta a muerte celular	78
Figura R16. La muerte celular es dependiente del metabolismo energético prevalente en la célula	79
Figura R17. El tratamiento con DCA frena la proliferación celular y cambia el fenotipo metabólico de células G	80
Figura R18. El DCA promueve la diferenciación mitocondrial en células G	81
Figura R19. Regulación del fenotipo metabólico de las células HepG2	82
Figura R20. El tratamiento de células HepG2 con OL resulta en la pérdida de funcionalidad mitocondrial	83

Figura R21. El análisis por qPCR a tiempo real apoya la represión de la biogénesis mitocondrial en células HepG2 tratadas con OL	84
Figura R22. El fenotipo glucolítico de las células G no es reversible	85
Figura R23. Las células G presentan alteraciones ultraestructurales de sus mitocondrias	86
Figura R24. Las mitocondrias G carecen de dímeros de la ATP sintasa	87
Figura R25. El tratamiento con OL promueve la transformación morfológica <i>in vitro</i> de las células G	88
Figura R26. Las células G no proliferan <i>in vitro</i>	88
Figura R27. Análisis de la actividad β -galactosidasa en células HepG2	89
Figura R28. El fenotipo G muestra un mayor daño oxidativo	90
Figura R29. Análisis de la expresión de los genes más comúnmente alterados en las vías de señalización de senescencia prematura y estrés oxidativo	91
Figura R30. Caracterización de la vía de senescencia activada en células G	92
Figura R31. La pérdida de la función bioenergética de la mitocondria en células G está asociada con su resistencia a estímulos de muerte celular	93
Figura R32. Estudio del fenotipo bioenergético en el panel de células del NCI-60	96
DISCUSIÓN	
Figura D1. Factores de transcripción que coordinan la represión de la biogénesis mitocondrial en células G	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I1. Pequeñas moléculas que usan el metabolismo energético de la célula tumoral como diana terapéutica	27
Tabla M1. Oligonucleótidos	40
Tabla M2. Anticuerpos empleados en este trabajo	51
Tabla R1. Resultado del análisis estadístico	68
Tabla R2. Resumen de las rutas Kegg y Procesos Biológicos diferencialmente expresados entre células M y G	69
Tabla R3. Secuencias diferencialmente expresadas entre células M y G	70
Tabla R4. Datos de expresión de los marcadores del metabolismo energético en el panel del NCI-60	95

SUMMARY

Mitochondria play a central role in the homeostasis of higher eukaryotic cells. Among other activities they participate in the provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation, the execution of cell death and intracellular signaling by Ca^{2+} and reactive oxygen species (ROS). Mitochondrial impairment is involved in a large number of human pathologies which include cancer. “Cancer cells in the presence of oxygen have an enhanced glycolytic phenotype”. This observation led Otto Warburg to suggest in the early days of the previous century that the bioenergetic activity of mitochondria must be impaired in the cancer cell. However, Warburg’s hypothesis was largely neglected until recently when the “abnormal” energetic metabolism of the cancer cells has emerged with renewed clinical and biotechnological interest. In this PhD. Thesis we have addressed the role that mitochondria play in cancer biology. To this aim we have generated three HCT116-derived colorectal carcinoma cell lines that exhibit large structural, molecular and functional differences in their mitochondria and characterized their *in vivo* tumor forming capacity. We show that repression of mitochondrial differentiation is a required phenotypic condition to promote colon cancer progression. Moreover, we illustrate that the bioenergetic signature informs of the activity of oxidative phosphorylation which defines the rate of glucose utilization by aerobic glycolysis sustaining the relevance of the Pasteur Effect in cancer biology. The acquisition of this metabolic trait provides the cancer cell a cell-death resistant phenotype that contributes to the accretion of tumor mass because it limits the potential for ROS signaling mediated by mitochondrial oxidative phosphorylation. Fortunately, the metabolic phenotype of colon cancer cells and tumors is a reversible trait that could be modulated by pharmacological treatment with activators of mitochondrial metabolism. Likewise, the enforced glycolysis of cancer cells and tumors offers an excellent target for the treatment of colon cancer using small alkylating agents that trigger massive necrotic cell death.

Contrary to the findings in colon cancer cells, we show that repression of mitochondrial differentiation in the HepG2 hepatocarcinoma triggers an irreversible cellular state of stress-induced premature senescence, most likely mediated by ROS signaling through the $\text{p16}^{\text{INK4A}}$ -Rb pathway, further suggesting the potential use of this strategy to halt liver cancer progression.

Consistent with recent findings of our group in human tumors we report that the bioenergetic signature of the NCI-60 cell line panel of cancer cells is basically the same irrespective of the tissue of origin strongly supporting that cancer abolishes the tissue-type specific differences in the phenotype of energetic metabolism. Overall, the results in this Thesis support that energetic metabolism represents an additional hallmark of the cancer phenotype that affords a promising target for the treatment of diverse neoplasias.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La mitocondria.

1.1.1. Papel en la fisiología celular.

Las mitocondrias son orgánulos celulares de doble membrana extremadamente dinámicos presentes en la mayoría de las células eucarióticas. En su interior contienen su propio genoma y sistema de transcripción y traducción (Attardi y Schatz, 1988; Scarpulla, 2008). Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la fisiología de la célula ya que son las encargadas de producir la mayor parte de la energía metabólica mediante la oxidación de sustratos en un proceso acoplado a la fosforilación oxidativa. Además, la mitocondria está implicada en la transducción de señales mediadas por calcio (Satrustegui y cols., 2007) y especies reactivas de oxígeno (Brunelle y cols., 2005), así como en otros procesos entre los que cabe destacar la síntesis del grupo hemo, esteroides y lípidos, la descarboxilación oxidativa del piruvato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la oxidación de ácidos grasos, y la producción de precursores de la urea y de la gluconeogénesis. Además, en los últimos años, se ha descrito el papel fundamental que desempeña este orgánulo como sensor y ejecutor del programa de muerte celular (Reed, 1997; Green, 1998; Kroemer y cols., 1998; Ravagnan y cols., 2002; Jaattela, 2004).

El contenido de mitocondrias por célula es variable y su estructura y composición molecular específica de cada tipo celular (Pagliarini y cols., 2008). Dependiendo de los requerimientos energéticos el fenotipo mitocondrial de la célula puede ser ajustado ya sea por causas fisiológicas o patológicas (Biswas y cols., 1999; Cuezva y cols., 2002; Rossignol y cols., 2004; Kulawiec y cols., 2006). La biogénesis de la mitocondria es el resultado de la expresión coordinada del genoma nuclear y mitocondrial (Garesse y Vallejo, 2001; Scarpulla, 2008). El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble hebra que codifica para 13 polipéptidos implicados en OXPHOS, 2 rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs esenciales para la síntesis de proteínas en la mitocondria (Attardi y Schatz, 1988; Fernandez-Silva y cols., 2003). Se han descrito dos programas con regulación diferente, proliferación y diferenciación mitocondrial (Cuezva y cols., 1997), como responsables del aumento en el contenido de orgánulos por célula y de su acoplamiento energético, respectivamente. En este contexto, resulta lógico que la existencia de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que impactan en la función de la mitocondria estén frecuentemente asociadas con diferentes patologías humanas entre las que destacan encefalomiopatías, enfermedades neurodegenerativas (Ortega y Cuezva, 2004; Wallace, 2005) y el cáncer (Cuezva y cols., 2009).

1.1.2. Estructura y función de la H⁺-ATP sintasa mitocondrial.

Los complejos de la cadena respiratoria situados en la membrana interna de la mitocondria se encargan de transportar los equivalentes reducidos que provienen de la

oxidación de sustratos metabólicos hasta la molécula de oxígeno. Este transporte vectorial de electrones propicia la generación del gradiente electroquímico de H^+ a ambos lados de la membrana interna. La utilización de este gradiente de H^+ por el complejo V o H^+ -ATP sintasa produce la mayoría del ATP celular. Este complejo multiproteico se ha encontrado en la membrana plasmática de bacterias, en la membrana tilacoidal del cloroplasto de plantas y en la membrana interna mitocondrial de levaduras, plantas y animales. Está formado por dos subcomplejos claramente diferenciados, uno globular y soluble, F_1 que se encuentra expuesto a la matriz y posee la actividad catalítica (Boyer, 1997; Karrasch y Walker, 1999), y otro liposoluble, F_0 , embebido en la membrana interna y que actúa como canal de protones (Lutter y cols., 1993; Karrasch y Walker, 1999) (Fig. II). El subcomplejo F_0 es un motor giratorio y como resultado del transporte de protones a su través en condiciones fisiológicas promueve los cambios conformacionales en el subcomplejo F_1 , conduciendo así la síntesis de ATP dirigida por el gradiente electroquímico ($\Delta\mu H^+$) (Capaldi y Aggeler, 2002).

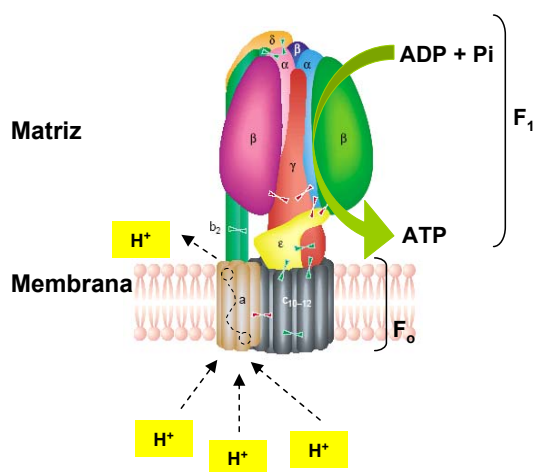


Figura II. Estructura de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial. Disposición de las subunidades de la H^+ -ATP sintasa. Una de las subunidades α ha sido eliminada del dominio F_1 para mostrar la subunidad γ dentro del dominio $\alpha\beta\gamma$. Hay tres subunidades $\alpha\beta$, mostradas en rosa, verde y azul (β en oscuro y α en claro). El dominio $\alpha\beta\gamma$ está unido a la subunidad a (marrón) del dominio F_0 por un tallo periférico compuesto por la subunidad δ y dos subunidades b . El anillo formado por la subunidad c de F_0 está unido a las subunidades γ y ϵ y forman el eje central del rotor. El complejo enzimático sólo es capaz de sintetizar ATP a partir de la translocación de H^+ cuando ambas partes se encuentran unidas.

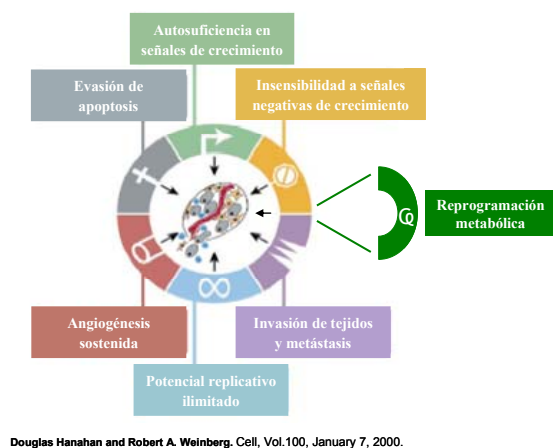
La subunidad β del subcomplejo F_1 (β -F1-ATPasa) es la subunidad catalítica que finalmente dirige el proceso de transducción energética. Está codificada por un único gen en el genoma nuclear humano (Neckelmann y cols., 1989) y de rata (Izquierdo y cols., 1995a) y su transcripción produce una única especie de mRNA (Ricart y cols., 1997), a diferencia de otras subunidades del mismo complejo (α y γ) (Breen, 1988; Neckelmann y cols., 1989). Por este motivo, variaciones en la cantidad relativa de la proteína suelen reflejar cambios en la actividad transcripcional del gen y/o de la traducción del mensajero. Más recientemente, se ha demostrado en modelos de levadura la implicación de la H^+ -ATP sintasa, concretamente de las subunidades e y g , en la dimerización y correcto plegamiento de la membrana mitocondrial interna (Giraud y cols., 2002; Paumard y cols., 2002; Goyon y cols., 2008), habiéndose sugerido que el inhibidor fisiológico de la H^+ -ATP sintasa, IF1, realiza la misma función en la mitocondria de mamífero (Campanella y cols., 2008).

1.1.3. El cáncer y la mitocondria.

El término cáncer comprende un conjunto heterogéneo de enfermedades que resultan de la aparición de células aberrantes que proliferan de manera descontrolada y se propagan por el organismo gracias a su capacidad para invadir otros tejidos y penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos (metástasis). En la actualidad, el cáncer representa la primera causa de mortalidad en hombres y la segunda en mujeres (López-Abente y Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, 2007). Se han descrito hasta el momento más de un centenar de tipos de cáncer que suelen clasificarse en categorías según el órgano o tejido en el que se originan, así como por el tipo específico de células presentes en el tumor. Los carcinomas representan el 90%, y por tanto la mayoría de los tumores, y son aquellos que se generan por células epiteliales. Pueden subdividirse en adenocarcinomas (glándulas), escamosos o epidermoides (células epiteliales no glandulares), basocelulares (capa de células epiteliales más profunda de la epidermis) y melanomas (melanocitos). Los otros tipos mayoritarios de cáncer son los sarcomas, derivados de tejido conectivo, las leucemias, linfomas o mielomas, que derivan de células sanguíneas, y los neuroblastomas o gliomas, derivados del sistema nervioso. Los distintos tipos de cáncer tienen presentaciones clínicas y evoluciones específicas, lo cual lleva a considerarlos como enfermedades diferentes. Los tumores colorrectales suponen la segunda causa de muerte por cáncer y entre un 22 y un 36% de los casos se detectan en estado avanzado. En España se producen 11.000 nuevos casos por año y la mortalidad es de 10 muertes por cada 100.000 habitantes y año (López-Abente y Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, 2007). La tasa de supervivencia a 5 años supone el 90% en las personas con detección temprana de la enfermedad, pero se reduce al 8% en los casos en los que el tumor es detectado cuando se ha extendido a otros órganos. La cirugía representa el único tratamiento con capacidad curativa en este tipo de neoplasia. Los hepatocarcinomas representan el 75% de los casos de cáncer de hígado diagnosticados en adultos (500.000 personas cada año). Hoy en día sólo tiene cura en los casos minoritarios en los que se detecta en una fase temprana de evolución, de forma que el tratamiento suele reducirse a medidas paliativas que ayuden a mejorar la calidad de vida del paciente.

La identificación de mutaciones en genes implicados en el proceso de oncogénesis ha sido un pilar fundamental en el estudio del cáncer. De esta manera se han descrito mutaciones que producen oncogenes con una ganancia de función y genes supresores de tumor con una pérdida de función en células cancerígenas humanas y modelos animales. Las proteínas codificadas por estos genes normalmente regulan la proliferación, la diferenciación, la muerte celular (Vogelstein y Kinzler, 2004) y la reparación del DNA (Parsons y cols., 1993). La tumorigénesis es un proceso de transformación secuencial de células normales en derivados cada vez más malignos. Las seis características que definen el fenotipo de una célula tumoral fueron brillantemente resumidas en un trabajo seminal en el año 2000 por D. Hanahan y R. Weinberg y son: potencial de replicación ilimitado, angiogénesis,

evasión de apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a señales antiproliferativas así como invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Recientemente, la reprogramación metabólica se ha incorporado como la séptima característica adquirida por la célula tumoral, y define la adquisición de un metabolismo esencialmente glucolítico (Cuezva y cols., 2007; Kroemer y Pouyssegur, 2008; Ortega y cols., 2009a) (Fig. I2).



Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. Cell, Vol.100, January 7, 2000.

Figura I2. Características fenotípicas de la célula tumoral.

Capacidades funcionales adquiridas durante el desarrollo tumorigénico en la gran mayoría de los cánceres humanos. Recientemente, la reprogramación metabólica, entendida como la adquisición del fenotipo metabólico glucolítico, ha sido incorporada como la séptima condición necesaria para que se produzca la transformación celular.

Varios autores han descrito que alteraciones del metabolismo están asociadas con la pérdida de función mitocondrial en células cancerígenas (Cuezva y cols., 2002; Simonnet y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004). Pero sin duda, los trabajos pioneros en este campo de investigación fueron llevados a cabo por el científico alemán Otto Warburg a comienzos del siglo pasado. En su trabajo describió que en condiciones de aire saturado de oxígeno, las células tumorales del líquido ascítico de ratón mostraban un mayor aporte de ATP por vía glucolítica que las células de hígado y de riñón de animales adultos, muy posiblemente a consecuencia de un daño irreversible en la función de sus mitocondrias (Warburg, 1956b, a). Su hipótesis es una extensión del principio de regulación metabólica conocido como efecto Pasteur que, en terminología actual, se refiere a que el flujo glucolítico de una célula está controlado por la producción de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. De modo que si existe un daño funcional en la mitocondria que pueda comprometer la provisión de energía celular, la respuesta de la célula es la inducción de la vía glucolítica. Esta hipótesis fue muy debatida en los años 50-60 y finalmente abandonada, sin haber sido formalmente contrastada, por el desarrollo de la Biología Molecular. Así, la teoría de Warburg fue básicamente ignorada (Warburg, 1966; Weinhouse, 1976; Krebs, 1981) o sencillamente considerada un epifenómeno de la transformación celular (Garber, 2006) hasta comienzos del siglo pasado, resultando en buena parte contrastada (revisado en (Ortega y cols., 2009a)).

En la actualidad, muchos estudios bioquímicos, moleculares, funcionales y clínicos

han confirmado que la mayoría de los tumores humanos y células cancerígenas, incluso en presencia de oxígeno, tienen tasas de consumo de glucosa y producción de lactato extremadamente altas cuando se comparan con los tejidos normales, haciendo extensiva la hipótesis de Warburg a muy diferentes neoplasias (Ortega y cols., 2009a).

1.2. El metabolismo energético de la célula tumoral.

1.2.1. La glucolisis es el metabolismo energético de células proliferativas.

La proliferación en células normales está asociada con un drástico aumento en el flujo de glucolisis aerobia (revisado en (Cuezva y cols., 2009)). En linfocitos, la estimulación de la actividad glucolítica es coincidente con el pico de síntesis de DNA celular (Wang y cols., 1976). Del mismo modo se ha demostrado que la respiración mitocondrial y la producción de ROS disminuye en timocitos proliferativos (Brand y Hermfisse, 1997) (Fig. I3A). En este sentido, células humanas derivadas de carcinoma de mama en confluencia detienen su proliferación y disminuyen el flujo glucolítico de manera muy significativa (Fig. I3B). No es por tanto de extrañar que en ausencia de factores de crecimiento que estimulen la proliferación celular se pierda la expresión de transportadores de glucosa y aminoácidos en células-T (Edinger y Thompson, 2002; Maciver y cols., 2008). Éstas, al ser estimuladas con interleuquina 7 (IL-7), favorecen el transporte a través de GLUT-1, el consumo de glucosa y la consiguiente progresión del ciclo celular de forma PI3K-Akt-dependiente (Barata y cols., 2004; Maciver y cols., 2008; Wofford y cols., 2008).

Las células no proliferativas (quiescentes) presentan una demanda de glucosa menor que las células proliferativas porque su necesidad de esqueletos carbonados para procesos biosintéticos es menor y porque los sustratos son oxidados de forma terminal por la actividad mitocondrial (Cuezva y cols., 2009). La respiración mitocondrial acoplada a la fosforilación oxidativa proporciona a la célula una gran cantidad de energía en forma de ATP. Sin embargo, en estas condiciones el esqueleto de carbono de la glucosa es completamente oxidado a CO₂ y por tanto no proporciona materia para procesos biosintéticos (Fig. I3C) (Cuezva y cols., 2009). Además, en la gran mayoría de las células la respiración mitocondrial es responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. I3C) que pueden convertirse en moléculas tóxicas, capaces de inducir daño en distintos componentes celulares (DNA, proteínas, lípidos) cuando la defensa antioxidante celular no responde adecuadamente. De forma contraria, las células proliferativas consumen grandes cantidades de glucosa y oxidan parcialmente su esqueleto carbonado a lactato, el cual es excretado de la célula para regenerar el NAD⁺ necesario para el funcionamiento de la glucolisis (Fig. I3C). En este sentido, se ha sugerido que una elevada glucolisis acompañada de una actividad mitocondrial comprometida, sería el metabolismo energético que proveería a la célula proliferativa de los precursores y energía necesarios para la duplicación y ensamblaje de los precursores en macromoléculas (Fig. I3C). Asimismo, una disminución de la actividad mitocondrial en la célula cancerígena supone una garantía de una menor producción de ROS en una situación

en la que el DNA resulta altamente vulnerable por estar desnudo (Cuezva y cols., 2009). Las células proliferativas presentan disfunciones en el ciclo de Krebs y liberan más citrato de la mitocondria con objeto de suplir los requerimientos de acetil-CoA citoplasmáticos que se precisan para la síntesis de ácidos grasos (Kuhajda y cols., 1994; Hatzivassiliou y cols., 2005) y colesterol (Parlo y Coleman, 1986), aunque hay que tener en cuenta que la oxidación de la glutamina en la mitocondria en las células cancerígenas puede proveer al ciclo de Krebs de esqueletos carbonados (Brand, 1985; DeBerardinis y cols., 2007).

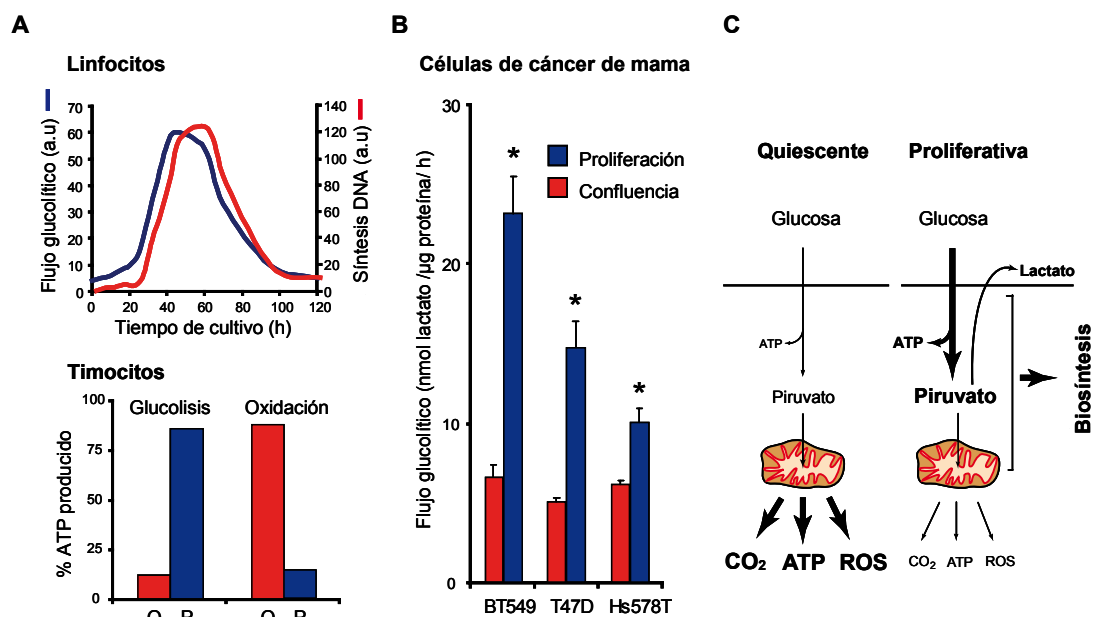


Figura I3. El fenotipo glucolítico de la célula proliferativa. (A) La proliferación en células normales está asociada con un drástico aumento del flujo glucolítico. En el panel superior se representa el flujo glucolítico (en azul) y la síntesis de DNA (en rojo) con respecto al tiempo en linfocitos estimulados a proliferar (datos redibujados de (Wang, 1976)). El panel inferior representa la producción de ATP en timocitos quiescentes (Q, barras en rojo) y proliferativos (P, barras en azul) (datos obtenidos de (Brand, 1997)). (B) Determinación del flujo glucolítico en tres líneas celulares derivadas de carcinoma de mama humano durante la fase de proliferación (en azul) y en confluencia (en rojo). Los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *, $p < 0.05$ en comparación por *t-student* frente a confluencia. (C) Esquemas representativos del fenotipo metabólico de una célula quiescente y proliferativa. En células quiescentes la mayor parte de la glucosa consumida es completamente oxidada en la mitocondria generando CO₂ y gran cantidad de ATP por OXPHOS. La actividad de la cadena respiratoria es responsable de la producción de ROS. Sin embargo, las células proliferativas consumen mucha más cantidad de glucosa que oxidan parcialmente en el citosol mediante la glucolisis generando así lactato que es excretado de la célula. El elevado flujo glucolítico proporciona intermediarios metabólicos necesarios para la síntesis de macromoléculas requeridas para la duplicación del material celular y la menor utilización mitocondrial del piruvato contribuye a minimizar la producción de ROS (Figura tomada de Cuezva, 09).

Una conclusión inmediata que se infiere del fenotipo particular de una célula proliferativa, es que la proliferación sólo es factible cuando no existen restricciones energéticas en el entorno celular, siendo la glucolisis el proceso metabólico encargado de la provisión de materia y energía que confiere a la célula tumoral la estrategia correcta para satisfacer su demanda energética, y por tanto, favorecer el crecimiento tumoral independientemente de su repercusión metabólica sobre el hospedador (Fig. I3).

1.2.2. La glucolisis aerobia controla la progresión del ciclo celular.

En este contexto en el que vinculamos estrechamente la proliferación celular a la estimulación de la actividad glucolítica, es casi de obligada reflexión considerar que la actividad de las vías responsables de la provisión de energía metabólica se encuentre finamente regulada durante el ciclo celular. En *S. cerevisiae* se conocen un gran número de genes relacionados con el metabolismo energético cuya expresión está coordinada de forma periódica durante el ciclo celular (Klevecz y cols., 2004; Tu y cols., 2005). El ciclo metabólico de levaduras se considera dividido en tres fases bien diferenciadas: (i) la fase oxidativa, en la cual se transcriben los componentes de la maquinaria de traducción y por tanto, es coincidente con un pico de síntesis de RNA, (ii) la fase reductiva constructiva, que comprende la expresión de genes nucleares que codifican componentes mitocondriales, y (iii) reductiva de carga, en la cual se expresan genes implicados en glucolisis, hidrólisis de los carbohidratos almacenados y de la ruta de las pentosas fosfato (Klevecz y cols., 2004; Tu y cols., 2005). Del mismo modo, la estimulación de la proliferación de linfocitos humanos coincide con un pico de síntesis de RNA que es anterior al aumento del flujo glucolítico y síntesis de DNA (Wang y cols., 1976).

Estudios más recientes han demostrado que la formación de membranas mitocondriales, así como la síntesis de mtDNA y diversas proteínas de la cadena respiratoria se lleva a cabo durante la fase S del ciclo (Martinez-Diez y cols., 2006), coincidiendo temporalmente con el drástico aumento de la glucolisis que se produce en la fase reductiva del ciclo celular. Sin embargo, hay que resaltar que las mitocondrias completamente funcionales no se sintetizan hasta el final de la fase G2/M (Martinez-Diez y cols., 2006), lo cual se considera un mecanismo que garantiza que el paso a la fase oxidativa del ciclo (G1) sucede cuando el DNA está completamente empaquetado, el ciclo celular ha concluido y la célula está energéticamente preparada para afrontar la biosíntesis de componentes celulares. Este es el punto del ciclo celular (G2/M) donde la proteína β -F1-ATPasa, cuello de botella de la fosforilación oxidativa, es sintetizada preferentemente mediante la activación traduccional de su RNA mensajero (Martinez-Diez y cols., 2006). El aporte energético que las células necesitan para hacer frente a las demandas de la fase oxidativa del ciclo celular se satisface antes de que se produzca la entrada en la fase reductiva del ciclo (fase S). En este sentido, células tratadas con oligomicina, un inhibidor específico de la H^+ -ATPasa, quedan arrestadas transitoriamente en el paso G1/S (Van den Bogert y cols., 1988; Santamaria y cols., 2006). Del mismo modo en *D. melanogaster*, mutaciones en el gen que codifica la subunidad Va de la citocromo c oxidasa, y que limita por tanto la cantidad de ATP disponible, inducen el arresto del ciclo en la transición G1/S (Mandal y cols., 2005). Otro ejemplo ilustrativo de arresto en la transición G1/S del ciclo, se produce cuando las células crecen en condiciones de baja disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo (Jones y cols., 2005). Este punto de control metabólico en el ciclo está regulado por la activación de la proteína quinasa AMP (AMPK-AMP-activated Protein Kinase), que

es considerada como el sensor energético de la célula (Jones y cols., 2005) y promueve la fosforilación de p53 en el residuo de Ser15 favoreciendo su acumulación y parada del ciclo celular (Imamura y cols., 2001).

AMPK es responsable del control de la actividad metabólica mediante la inhibición de los procesos anabólicos consumidores de ATP tras la limitación de nutrientes (Hardie y cols., 1998). Esta proteína inactiva las enzimas HMG-CoA reductasa y la acetil-CoA carboxilasa inhibiendo así la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos respectivamente (Shaw, 2006). Otro de los efectos producidos por la activación de AMPK es la represión de la biosíntesis de proteínas mediante la supresión de la vía de mTOR sensible a rapamicina (Inoki y cols., 2003; Gwinn y cols., 2008). Muy recientemente, el complejo mTOR-raptor se ha propuesto como controlador directo de la actividad mitocondrial, sugiriendo la existencia de una regulación cruzada entre la mitocondria y la actividad de mTOR durante el ciclo celular (Schieke y cols., 2006; Schieke y cols., 2008). El arresto del ciclo celular constituye pues un mecanismo de emergencia que la célula activa transitoriamente con el fin de evitar una pérdida generalizada de energía que le llevaría, inevitablemente, a la ejecución de muerte ya sea de tipo apoptótica y/o necrótica. Una vez que la célula ha superado la transición G1/S del ciclo, la función bioenergética de la mitocondria es reprimida por la actividad de la ciclina D1 (Sakamaki y cols., 2006; Wang y cols., 2006). Esta proteína está implicada en la hipofosforilación e inactivación de la proteína retinoblastoma (Rb), proceso que define la entrada de la célula en fase S. La ciclina D1 está por tanto considerada como la molécula encargada de controlar el cambio metabólico desde la fase oxidativa a la fase reductiva del ciclo con objeto de minimizar la producción de ROS en un momento en el cual el material genético resulta especialmente vulnerable (Brand y Hermfisse, 1997; Chen y cols., 2007; Cuezva y cols., 2009).

1.2.3. Genes del cáncer y metabolismo glucolítico de los tumores.

La revitalización del metabolismo energético, y por extensión del “interés mitocondrial” en la biología del cáncer, ha experimentado un fuerte impulso en los últimos años debido al interés clínico y biotecnológico que puede suponer el metabolismo de la célula tumoral como estrategia para combatir la enfermedad. La mayoría de los estudios orientados a entender las bases moleculares del fenotipo altamente glucolítico del cáncer discuten la existencia de nexos de unión entre los oncogenes y/o genes supresores de tumor con la expresión de enzimas de la vía glucolítica y/o del metabolismo oxidativo mitocondrial.

El oncogén *c-myc*, que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las células cancerígenas, está implicado en la transactivación de un gran número de enzimas de la vía glucolítica, entre ellas la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA) y el transportador de glucosa GLUT1 (Shim y cols., 1997; Osthus y cols., 2000). Así, *c-myc* se perfila como un candidato potencial responsable del aumento de consumo de glucosa y producción de lactato

durante la proliferación de las células cancerígenas (Fig. I4). En un estudio más reciente, se ha demostrado que, consistente con su implicación en proliferación, este oncogén controla la expresión transcripcional de genes esenciales para la biogénesis mitocondrial (Kim y cols., 2008) (Fig. I4), así como de la coordinación de eventos metabólicos y reguladores que son necesarios para la entrada y progresión a través del ciclo (Morrish y cols., 2008). En este aspecto, la dosis de *c-myc* es un parámetro fundamental que define el proceso de tumorigénesis (Dang y cols., 2008) y condiciona la expresión de sus genes diana (Fernandez y cols., 2003).

Está ampliamente admitido que en un determinado estadio del progreso tumoral las células cancerígenas son capaces de sobrevivir en ambientes hipóxicos. La hipoxia actúa como regulador del metabolismo energético y puede redirigir a las células cancerígenas a explotar la glucólisis como fuente de provisión de ATP cuando hay limitación de oxígeno (Fang y cols., 2008). La respuesta celular a hipoxia se encuentra regulada por HIF1 α (*Hypoxia-inducible Factor 1 α*) que en condiciones limitantes de oxígeno se estabiliza e induce la expresión del transportador de glucosa GLUT1, diversas enzimas glucolíticas, así como factores que promueven angiogénesis, señales de crecimiento y supervivencia (Semenza y cols., 1994; Ebert y cols., 1995). Recientemente, se ha descrito que *c-myc* y HIF1 α actúan de forma sinérgica para promover la expresión de las enzimas piruvato deshidrogenasa kinasa 1 (PDK1) y hexokinasa II (HK-II), favoreciendo por un lado la inactivación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) y por otro el metabolismo glucolítico de las células tumorales (Kim y cols., 2007a). Se ha demostrado que HIF1 α altera la actividad de la citocromo c oxidasa (COX) cambiando la composición molecular del complejo IV de la cadena respiratoria (Fig. I4). Parece ser que la expresión preferencial de COX4-2 en hipoxia (en lugar de COX4-1) contribuye a una transferencia más eficiente de electrones al oxígeno limitando así la producción de especies reactivas de oxígeno en esta situación (Fukuda y cols., 2007). Además, se ha demostrado que mutaciones de ganancia de función en HIF1 α en carcinomas renales, favorece indirectamente la represión de la biogénesis mitocondrial (Zhang y cols., 2007). Por otro lado, la deficiencia del factor von Hippel-Lindau (VHL) promueve la activación constitutiva de HIF1 α bajo condiciones de normoxia (Fig. I4) (Ivan y cols., 2001; Jaakkola y cols., 2001; Kondo y cols., 2002). Finalmente, HIF1 α media en la activación de MXL1, que inhibe la actividad transcripcional de *c-myc* resultando en una inhibición de la biogénesis mitocondrial (Fig. I4) (Li y cols., 2005b; Zhang y cols., 2007).

El oncogén Akt regula la proliferación, la supervivencia celular y promueve el aumento glucolítico de forma dosis-dependiente que resulta fundamental para la supervivencia celular mediada por Akt en ausencia de factores de crecimiento (Cheng y cols., 1997; Rathmell y cols., 2003) (Fig. I4). Así, la sobreexpresión de Akt en melanomas radiales no invasivos promueve la expresión de enzimas de la vía glucolítica, estimula la glucólisis y favorece la transformación hacia un fenotipo de crecimiento vertical invasivo

(Govindarajan y cols., 2007). En estudios más recientes, se ha demostrado que defectos en la respiración mitocondrial causados por manipulación genética, química o estrés hipóxico producen la inactivación de PTEN a través de un mecanismo redox que activa a Akt (Fig. I4) y resulta finalmente en resistencia a los fármacos y ventajas de supervivencia en condiciones de hipoxia (Pelicano y cols., 2006).

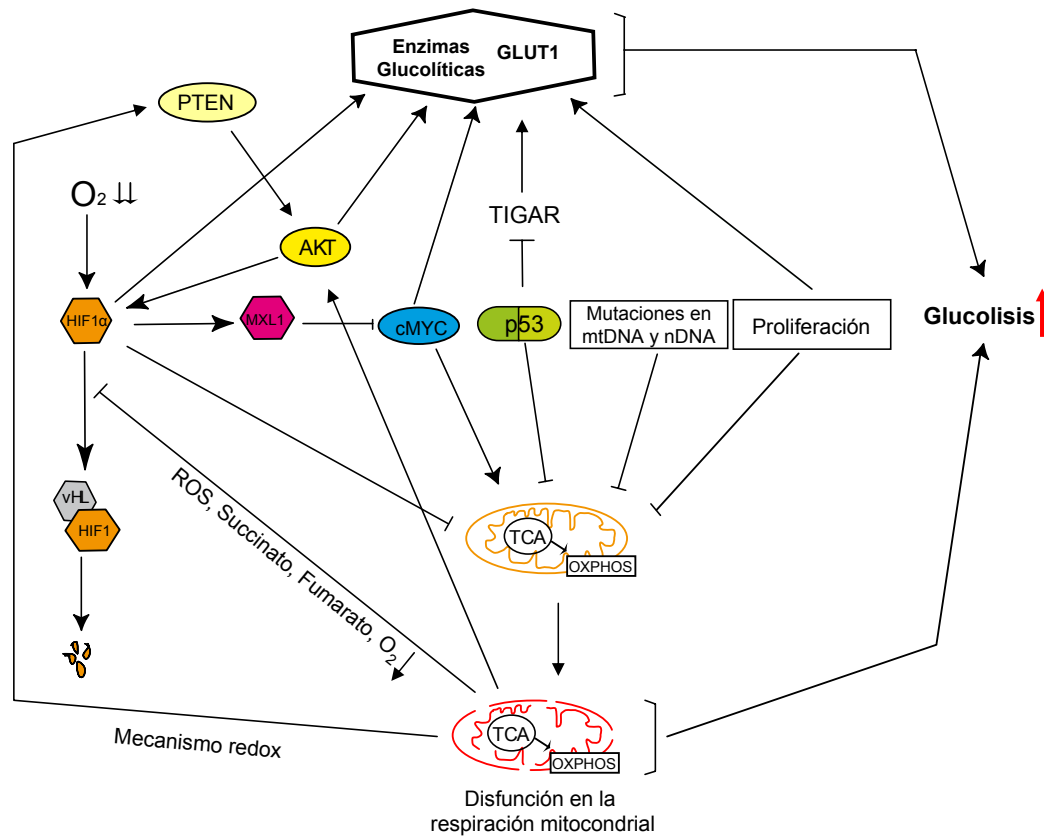


Figura I4. Bases moleculares del cáncer. El diagrama ilustra las diversas rutas que pueden inducir el fenotipo glucolítico observado en las células cancerígenas. La proliferación favorece el metabolismo glucolítico y limita la producción de ATP por vía mitocondrial. Mutaciones de ganancia de función en los oncogenes Akt y *c-myc* conllevan un aumento en el flujo glucolítico a través de la inducción del transportador de glucosa GLUT1 y/o enzimas glucolíticas. La inactivación de PTEN por defectos en la respiración mitocondrial resulta en la activación de Akt. Mutaciones de pérdida de función en el supresor tumoral p53 estimula la glucólisis mediante la inactivación de TIGAR y compromete la respiración mitocondrial simultáneamente. El ambiente hipóxico en el que se desarrolla el tumor estabiliza HIF1α, que refuerza la glucólisis mediante la estimulación de la actividad de las enzimas glucolíticas y la restricción de la fosforilación oxidativa. Por otro lado, la existencia de mutaciones en DNA mitocondrial (mtDNA) y/o nuclear (nDNA) limitan la actividad de la mitocondria y favorecen la glucólisis en las células tumorales. Deficiencias en el metabolismo y respiración mitocondrial pueden promover la producción de ROS, y de los intermediarios metabólicos fumarato o succinato, lo que finalmente puede provocar la estabilización de HIF1α. Mutaciones de pérdida de función de VHL impide la degradación de HIF1α que puede inhibir la biogénesis mitocondrial mediante la activación del inhibidor de *c-myc*, MXL1 (Figura tomada de Cuezva, 09).

Otro gen que colabora en esta compleja transformación metabólica es el supresor tumoral p53. Esta proteína participa activamente en multitud de procesos en el contexto celular. Por un lado, se sabe que la sobreexpresión de una versión dominante negativa de

p53, situación que emula aquella producida en la mayoría de los tumores, promueve la inducción de la enzima HK-II y favorece el consumo de glucosa *in vivo* (Fig. I4) (Mathupala y cols., 1997; Smith y cols., 2006). Por otro lado, p53 es capaz de inducir la expresión de un nuevo inhibidor de la enzima fructosa bis-fosfatasa-2 denominado TIGAR, y de disminuir la expresión del transportador de glucosa GLUT1 (Schwartzberg-Bar-Yoseph y cols., 2004; Bensaad y cols., 2006). De este modo, mutaciones de pérdida de función de p53 resultan en la disminución de TIGAR y el aumento de la actividad transportadora de glucosa a través de GLUT1, lo que en último término, promueve un aumento en el flujo glucolítico celular (Schwartzberg-Bar-Yoseph y cols., 2004; Bensaad y cols., 2006; Bensaad y Vousden, 2007) (Fig. I4). Otros autores han demostrado que la proteína p53 es capaz de modular la actividad respiratoria de la mitocondria a través de la activación del factor de ensamblaje de la citocromo c oxidasa, SCO2 (Matoba y cols., 2006) (Fig. I4). En este sentido, la pérdida de función tanto de p53 como de SCO2 desencadena la disfunción respiratoria de la mitocondria y favorece el metabolismo glucolítico celular (Matoba y cols., 2006).

Además de la condición metabólica impuesta por la proliferación celular y la presión ejercida por el ambiente hipóxico en el cual el tumor se nutre y desarrolla, no hay que descartar la posibilidad de que el fenotipo glucolítico de las células tumorales pueda ser en parte el resultado de mutaciones en genes nucleares y/o mitocondriales que impacten en la actividad de la mitocondria (Fig. I4). En este sentido, se ha visto que la existencia de mutaciones en la succinato deshidrogenasa y fumarato hidratasa predisponen a padecer diferentes síndromes neoplásicos (revisado en (King y cols., 2006)). La acumulación de los intermediarios del ciclo de Krebs, succinato, fumarato y oxalacetato, así como otros metabolitos tales como piruvato e incluso los ROS, promueven la estabilización de HIF1 α (Butow y Avadhani, 2004; Isaacs y cols., 2005; Selak y cols., 2005) (Fig. I4) habiéndose correlacionado con el fenotipo Warburg de los tumores (Lu y cols., 2005; McFate y cols., 2008).

Se ha propuesto la existencia de múltiples mutaciones en el mtDNA que interfieren con la fosforilación oxidativa, aumentan la producción de ROS y promueven la proliferación del tumor (Brandon y cols., 2006) (Fig. I4). De hecho, los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial presentan una menor actividad en cáncer debido a la disminución en la expresión de subunidades codificadas en el DNA mitocondrial (Krieg y cols., 2004). Las células que carecen completamente de DNA mitocondrial (células ρ^0) han sido ampliamente utilizadas como modelo para definir la implicación del mtDNA en la progresión del cáncer, y han generado una gran controversia en el campo (Morais y cols., 1994; Cavalli y cols., 1997). Algunos autores han afirmado que este modelo celular no es representativo de una célula tumoral ya que éstas no carecen totalmente de moléculas de mtDNA. Por ello, en los últimos tiempos están siendo utilizadas células con deplecciones parciales de mtDNA (denominadas ρ^-) o bien células con mutaciones puntuales para

llevar a cabo estudios que ayuden a esclarecer el papel que desempeña el DNA mitocondrial en el proceso de tumorigénesis (Petros y cols., 2005), crecimiento tumoral (Shidara y cols., 2005), metástasis (Ishikawa y cols., 2008) e invasión (van Waveren y cols., 2006).

1.3. Traslación de la mitocondria al ámbito clínico.

1.3.1. La huella bioenergética del cáncer.

El hepatocito de rata ilustra el cambio que se produce en la relevancia de las vías de obtención de energía en un determinado momento del desarrollo poniendo de manifiesto la importancia biológica del efecto Pasteur en células de mamífero (Valcarce y cols., 1988; Cuezva y cols., 1997). Así, durante la etapa fetal el hepatocito obtiene su energía metabólica fundamentalmente por glucolisis produciendo a su vez grandes cantidades de lactato (Cuezva y cols., 1997). Momentos después del nacimiento se produce un brusco descenso en el consumo de glucosa que se ve acompañado de un aumento paralelo en el consumo de oxígeno (Valcarce y cols., 1988; Luis y cols., 1993). Estos cambios metabólicos se ven reflejados por la distinta abundancia de enzimas glucolíticas y de la fosforilación oxidativa entre los hepatocitos fetales y neonatales, y son completamente análogos a los que suceden durante el proceso de transformación celular (Cuezva y cols., 1997; Cuezva y cols., 2007).

Estas observaciones llevaron a nuestro laboratorio a desarrollar una aproximación proteómica sencilla (Cuezva y cols., 2002) con el fin de poder trasladarla al campo de investigación del cáncer y contrastar la hipótesis de Warburg (Warburg, 1956b, a). En muestras tumorales y normales derivadas del mismo paciente se estudió la expresión de dos proteínas mitocondriales β -F1-ATPasa y Hsp60, representando una proteína bioenergética y estructural de la mitocondria respectivamente, así como una de las enzimas más importantes de la vía glucolítica, la gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004). Este estudio permitió derivar dos índices bioenergéticos que reflejan los dos niveles a los cuales la actividad bioenergética de la mitocondria puede estar comprometida en cáncer: β -F1-ATPasa/Hsp60 como estimación de la competencia bioenergética del orgánulo, y β -F1-ATPasa/GAPDH que informa de la actividad mitocondrial total de la célula (Cuezva y cols., 2002) y representa una simplificación del cociente β -F1-ATPasa/Hsp60/GAPDH o Índice Bioenergético Celular (BEC) (Cuezva y cols., 2002). Este análisis, denominado la *huella bioenergética del cáncer*, ha permitido identificar una alteración en el proteoma mitocondrial en cáncer que en algunos casos se acompaña de una inducción en la expresión de proteínas de la vía glucolítica, y que puede aplicarse a la mayoría de los tumores humanos (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004).

La relevancia funcional de este análisis proteómico *in vivo* se ha puesto de manifiesto muy recientemente al haberse demostrado la existencia de una correlación inversa entre la *huella bioenergética* y la tasa de captura de glucosa en tumores de pulmón mediante la técnica de tomografía de emisión de positrones (FDG-PET) (Lopez-Rios y cols., 2007).

Esta herramienta emplea el análogo no metabolizable de la glucosa 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa (FDG) como sonda para estimar la captura de glucosa por el tumor respecto al tejido no tumoral adyacente, y ha demostrado ser una de las técnicas más efectivas para la detección de tumores y sus metástasis, así como para el diagnóstico, seguimiento y pronosis de los pacientes con cáncer (Rigo y cols., 1996; Vansteenkiste y cols., 2004). Asimismo, la *huella bioenergética* correlaciona de forma inversa con la tasa de glucólisis aerobia en células derivadas de carcinoma colorrectal (Lopez-Rios y cols., 2007). El estudio de la *huella bioenergética* en largas series de pacientes ha sido fundamental para impulsar su traslación a la clínica. En este sentido, la expresión de la proteína β -F1-ATPasa es un marcador pronóstico que permite discriminar grupos de pacientes con cáncer que poseen un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007; Lin y cols., 2008).

1.3.2. La *huella bioenergética* como marcador de pronosis.

De acuerdo con el “fenotipo Warburg” de la célula tumoral, la *huella bioenergética* proporciona un marcador de la progresión del tumor en colon (Cuezva y cols., 2002; Lin y cols., 2008), pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007) y mama (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008). Los mecanismos que promueven la disminución de la expresión de la proteína β -F1-ATPasa en cáncer de humano todavía no han sido esclarecidos. Sin embargo, su expresión durante el desarrollo del hígado (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995b; Izquierdo y Cuezva, 1997; Ricart y cols., 2002), la progresión del ciclo celular (Martinez-Diez y cols., 2006) y en el proceso de carcinogénesis en el hígado de rata (de Heredia y cols., 2000; Cuezva y cols., 2007) está regulada por mecanismos post-transcripcionales que afectan a la localización, estabilidad y traducción de su RNA mensajero.

El control de la traducción del mensajero de β -F1-ATPasa (β -mRNA) está regulado por el extremo 3' no traducible (3'UTR) del mRNA (Izquierdo y Cuezva, 1997; Di Liegro y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000), así como por proteínas que se unen al mismo (β -mRNABPs) (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Cuezva y cols., 2007). La secuencia 3'UTR funciona como intensificadora de la traducción tanto *in vitro* (Izquierdo y Cuezva, 1997) como *in vivo* (Di Liegro y cols., 2000). En este sentido, el 3'UTR presenta una actividad funcional de iniciación interna de la traducción semejante a las secuencias IRES (Izquierdo y Cuezva, 2000). La unión de las proteínas β -mRNAs es específica de tejido (Izquierdo y Cuezva, 1997) y puede estar relacionada con la diferente eficiencia traduccional del mRNA en distintos tejidos de rata (Izquierdo y Cuezva, 1993). Hemos propuesto que la actividad inhibitoria de las β -mRNABPs puede deberse al impedimento estérico que estas pueden ejercer para el anclaje/avance de la maquinaria traduccional sobre el mRNA (Izquierdo y Cuezva, 2000). En este contexto, ha sido importante la identificación

de algunas de estas proteínas de interacción que pueden definir el fenotipo bioenergético de las células cancerosas con objeto de establecer nuevos marcadores moleculares de la progresión del cáncer que complementen a la *huella bioenergética* (Ortega y cols., 2009b).

Entre estas proteínas de unión a β -mRNA, hay que destacar la reciente identificación de la proteína HuR (Ortega y cols., 2008), un regulador central del control post-transcripcional de la expresión génica (Levy y cols., 1998) cuya actividad y localización subcelular están estrechamente controladas durante el ciclo celular y en cáncer (Wang y cols., 2000; Abdelmohsen y cols., 2007; Ortega y cols., 2008). A pesar de que esta proteína no está implicada en la modulación de la expresión de β -F1-ATPasa en diferentes tipos celulares de humano (Ortega y cols., 2008), el análisis de su expresión en una serie grande de pacientes con cáncer de mama ha puesto de manifiesto su relevancia como marcador pronóstico independiente de la *huella bioenergética* (Ortega y cols., 2008). Es más, el estudio de la expresión de HuR en combinación con marcadores de la *huella bioenergética* permite identificar aquellos pacientes que presentan un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Ortega y cols., 2008), lo cual supone un estímulo para la incorporación de esta proteína como marcador adicional a los ya descritos de la *huella bioenergética* (Cuezva y cols., 2002) en el seguimiento de pacientes con cáncer de mama. En este aspecto, nuestro laboratorio ha desarrollado recientemente la metodología para la cuantificación de la *huella bioenergética* (Acebo y cols., 2009). Esta metodología ha proporcionado por primera vez una herramienta que permite cuantificar la cantidad de estas proteínas en biopsias y su aplicación ha permitido estimar la demanda energética de diferentes tejidos humanos normales o afectados por cáncer (Acebo y cols., 2009).

La actividad de la mitocondria y la fosforilación oxidativa juega un papel fundamental en la correcta ejecución de la muerte celular (Santamaria y cols., 2006). En este sentido, la *huella bioenergética* también ha resultado ser un marcador de la respuesta de la célula a quimioterapia en carcinoma de colon (Shin y cols., 2005; Lin y cols., 2008) y de hígado (Santamaria y cols., 2006). Asimismo, la disminución en la expresión de β -F1-ATPasa en pacientes con cáncer de colon esta asociada con la respuesta de estos pacientes al agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5-FU) (Lin y cols., 2008). Por todo ello, la importancia de las proteínas del metabolismo energético en la prognosis y eventual tratamiento de pacientes con cáncer refuerzan la idea de trasladar la mitocondria a la investigación del cáncer.

1.4. Metabolismo energético y muerte celular.

Entre las características adquiridas por las células tumorales en su proceso de transformación hay que destacar la desregulación de la división y muerte celular producida por la alteración de las rutas de señalización correspondientes (Hanahan y Weinberg, 2000). Atendiendo a criterios esencialmente morfológicos, podemos distinguir entre muerte celular

de tipo apoptótica, que cursa con la fragmentación del DNA; necrosis, en la que se produce un hinchamiento de las organelas en el citosol; autofagia, con formación de vesículas autofágicas características, y la catástrofe mitótica, causada por fallos en la ejecución de la mitosis (Jaattela, 2004). De todos ellos el más frecuente, y por tanto el proceso mejor caracterizado, es la apoptosis.

1.4.1. La actividad mitocondrial es un supresor tumoral.

Las mitocondrias juegan un papel crucial en la correcta ejecución de apoptosis (Ferri y Kroemer, 2001; Jaattela, 2004) y diferentes estímulos que convergen en el orgánulo son los responsables de producir la permeabilización de la membrana mitocondrial y la subsiguiente liberación de proteínas que participan en la ejecución de la muerte celular (Wang, 2001). La familia de proteínas Bcl-2 son esenciales en la transferencia de la señal apoptótica a la mitocondria (Reed, 1997; Green y Kroemer, 2004; Lucken-Ardjomande y Martinou, 2005). En general, los estímulos que inducen apoptosis pueden ser divididos en fisiológicos, por mediación de receptores externos de muerte, y de estrés, que involucran la cascada de señalización vía mitocondria. En este sentido, se puede hablar de la existencia de dos cascadas de activación de apoptosis, la vía extrínseca (Kaltschmidt y cols., 2000) y la vía intrínseca o mitocondrial (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). Las células desarrollan estrategias para la evasión de la apoptosis como la inactivación de p53 (Slee y cols., 2004; Yee y Vousden, 2005), inducción de senescencia (Dimri, 2005), desregulación de la vía de señalización del receptor de muerte Fas (Muschen y cols., 2000), sobreexpresión de inhibidores de apoptosis (IAPs) (Deveraux y cols., 1998), disminución en la expresión de caspasas (Teitz y cols., 2000; Yang y cols., 2003), activación de la ruta de señalización de PI3K/Akt/PTEN (Testa y Bellacosa, 2001), así como la restricción de la actividad bioenergética de la mitocondria (Jaattela, 2004; Santamaria y cols., 2006).

Asimismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya generación depende mayoritariamente de la respiración mitocondrial, es un estímulo capaz de inducir cambios en las vías de transducción de señales que controlan la expresión de genes implicados en la ejecución de muerte celular (Chandra y cols., 2000; Klaunig y Kamendulis, 2004). Algunos estudios sugieren que los ROS pueden actuar a nivel de los poros mitocondriales alterando el potencial de membrana mitocondrial y liberación de proteínas mitocondriales (Votyakova y Reynolds, 2001), modificando la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X_L (Herrera y cols., 2001), o influenciando el estado de oxidación de ciertas proteínas celulares que participan en la inducción de apoptosis (Santamaria y cols., 2006).

El metabolismo de la célula está molecular y funcionalmente integrado con la muerte celular (Plas y Thompson, 2002; Danial y cols., 2003; Azoulay-Zohar y cols., 2004; Vahsen y cols., 2004) y tanto la fosforilación oxidativa como la H⁺-ATPasa son necesarias para la correcta ejecución de la muerte (Matsuyama y cols., 1998; Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006). En este sentido, la

actividad de la fosforilación oxidativa es requerida para la toxicidad inducida por Bax en levaduras (Harris y cols., 2000). Estudios de cribado genético en *S. cerevisiae* permitieron la identificación del complejo de la H⁺-ATP sintasa como elemento indispensable para la muerte mediada por Bax (Matsuyama y cols., 1998). Asimismo, la muerte mediada por Bax en levaduras es estrictamente dependiente de componentes mitocondriales tales como la subunidad β -F1-ATPasa (Gross y cols., 2000). Estudios muy recientes en células de mamífero han sido fundamentales para esclarecer los mecanismos de participación de la H⁺-ATPasa en la ejecución de muerte (Santamaria y cols., 2006). Este complejo enzimático está implicado en la generación de ROS en una fase temprana de la respuesta a muerte. Los ROS producen a su vez la oxidación y modificación covalente de proteínas mitocondriales (Santamaria y cols., 2006) por lo que se ha sugerido que facilitan su liberación promoviendo el desencadenamiento de la respuesta apoptótica (Santamaria y cols., 2006). La inhibición específica de la H⁺-ATPasa con oligomicina bloquea la producción de ROS y retrasa la ejecución de la muerte celular, apoyando así su relevancia en el control del daño celular y la ejecución de apoptosis (Santamaria y cols., 2006).

En los últimos años diversos estudios se han centrado en la identificación de un nexo de unión entre el metabolismo y la progresión tumoral mediante el uso de sistemas celulares y/o modelos animales. Así, la frataxina, una proteína mitocondrial deficiente en la ataxia de Friedreich, aumenta el metabolismo oxidativo y la síntesis de ATP (Ristow y cols., 2000) mediante la interacción con componentes de la cadena de transporte (Gonzalez-Cabo y cols., 2005) y/o regulando la síntesis de Fe/S en la célula (Thierbach y cols., 2005). Recientemente, se ha generado un modelo animal con alteración de la función mitocondrial en el hígado inducida por la disrupción del gen de la frataxina (Thierbach y cols., 2005). El animal resultante presentaba una vida más corta y una mayor frecuencia en la generación de tumores hepáticos (Thierbach y cols., 2005). Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión de esta proteína produce un aumento en la fosforilación oxidativa, disminuye el crecimiento celular, la formación de colonias así como el desarrollo de tumores (Schulz y cols., 2006). En este aspecto, otro modelo muy ilustrativo resulta de la expresión ectópica del gen supresor de tumor VHL en células deficientes en este gen, y la consecuente disminución en el ritmo de crecimiento tumoral (Iliopoulos y cols., 1995).

La inducción de estrés genético o metabólico en la mitocondria ha sido otra estrategia utilizada para promover alteraciones en la fosforilación oxidativa y asociar sus efectos con invasión y metástasis (Amuthan y cols., 2002). En este sentido, se ha descrito que el estrés mitocondrial en células C2C12 resulta en la promoción de un fenotipo invasivo (Amuthan y cols., 2001), probablemente como consecuencia de la sobreexpresión de la proteasa de la matriz extracelular cathepsina L y TGF- β , ambos marcadores clásicos de invasividad (Amuthan y cols., 2001).

El complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) es una pieza clave en el proceso de regulación entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Ortega y cols., 2009a).

La inhibición de la expresión de su modulador negativo la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) en células de carcinoma humano, deriva el flujo de piruvato a la mitocondria y promueve la actividad de la fosforilación oxidativa (McFate y cols., 2008). Asimismo, la activación de la PDH tiene efectos en proliferación celular e invasión (McFate y cols., 2008), todo ello pone de manifiesto los beneficios que puede tener la activación de la función mitocondrial en la lucha contra el cáncer.

Por otro lado, también se han desarrollado modelos de interferencia de la vía glucolítica con el fin de profundizar en su impacto sobre la progresión tumoral. La pérdida de la enzima glucolítica LDHA cursa con la reducción de la tasa de proliferación tumoral (Fantin y cols., 2006), una mayor funcionalidad mitocondrial, así como con una menor habilidad para proliferar en condiciones de hipoxia (Fantin y cols., 2006). En este contexto, la confirmación de los postulados de Warburg en cáncer lleva a reflexionar sobre la indiscutible función que la mitocondria tiene como supresor tumoral.

1.4.2. El metabolismo energético como diana terapéutica.

El metabolismo de la célula tumoral puede ser una pieza clave para el tratamiento del cáncer ya que puede definir la respuesta celular a la quimioterapia y/o radioterapia (Fig. 15) (revisado en (Cuezva y cols., 2009)). En las células tumorales en las que existe un metabolismo oxidativo activo se produce tras la terapia una señal de ROS que favorece la respuesta de muerte (Fig. 15) (Jaattela, 2004). Por el contrario, las células altamente dependientes de la glucólisis desarrollan fenotipos de resistencia, probablemente debido a la ausencia de una señal de ROS en respuesta a la misma terapia (Jaattela, 2004; Santamaria y

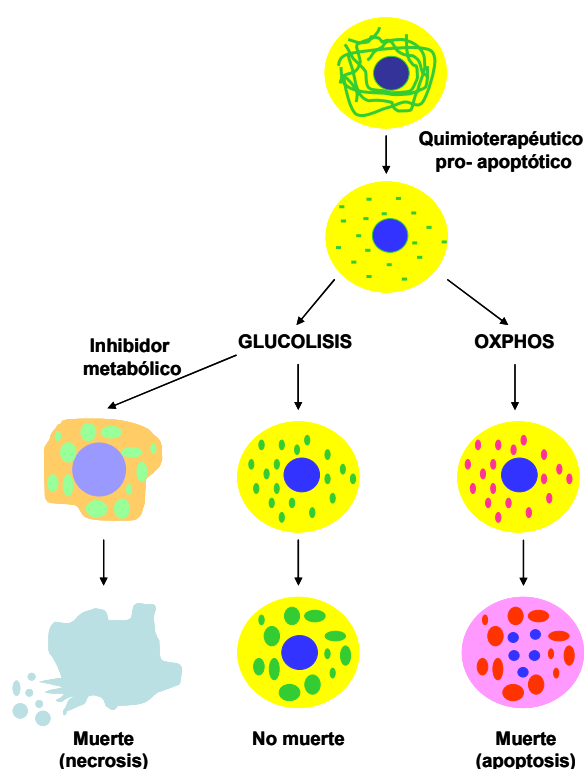


Figura 15. Metabolismo energético y muerte celular. Las células cancerígenas presentan distinta susceptibilidad a muerte inducida por fármacos quimioterapéuticos en función de su fenotipo metabólico. Como primer paso en la ejecución de muerte se produce el rápido dismantelamiento y fragmentación de la retícula mitocondrial en orgánulos pequeños (cuadrados en verde). Las células tumorales que dependen de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para la obtención de energía muestran un rápido aumento en la producción de ROS tras la terapia que oxidan las proteínas mitocondriales (puntos en rosa), favoreciendo así la liberación de proteínas de la mitocondria que participan en la eficiente ejecución de muerte celular por apoptosis (núcleos fragmentados en azul). Por otro lado, aquellas células tumorales altamente glucolíticas desarrollan fenotipos de resistencia a muerte por ausencia en la señalización por ROS (puntos en verde). En esta situación se ha propuesto el uso de inhibidores metabólicos que puedan inducir muerte de tipo necrótica en las células glucolíticas (célula rota en azul claro) (Figura tomada de Cuezva, 09).

cols., 2006). En este sentido, la estrategia de devolver a las células tumorales su dependencia por un metabolismo oxidativo puede restablecer la susceptibilidad de dichas células a los estímulos de muerte y promover así el arresto del crecimiento tumoral. Alternativamente, también parece plausible la utilización de inhibidores metabólicos que en las células glucolíticas bloqueen la producción de ATP por esta vía y promuevan la inducción de la muerte celular principalmente por vía necrótica (Fig. I5) (Zong y cols., 2004).

En los últimos años se ha aceptado que el metabolismo energético de las células tumorales también puede constituir una diana para el desarrollo de estrategias antitumorales que ayuden a combatir la progresión del cáncer (Garber, 2006; Kroemer y Pouyssegur, 2008). En este aspecto, pequeñas moléculas que interfieren con los mecanismos de provisión de energía en la célula han sido utilizadas ya sea en terapia individual o combinada (Tabla I1) (revisado en (Cuezva y cols., 2009)). Por ejemplo, la 2-desoxiglucosa (2DG), un análogo no-metabolizable de la glucosa, es fosforilado por la hexokinasa y bloquea el flujo glucolítico (Laszlo y cols., 1960; Brown, 1962) debido a que no puede ser metabolizado por la célula, lo cual conduce a la depleción de ATP y a la inducción de muerte celular (Maher y cols., 2004). Esta molécula ha sido utilizada para potenciar la susceptibilidad de gliomas a radioterapia (Mohanti y cols., 1996) y el efecto de otras quimioterapias en osteosarcomas, cáncer de cabeza y cuello, y de colon (Maschek y cols., 2004; Simons y cols., 2007; Hernlund y cols., 2008). Más recientemente, se han mostrado sus efectos en la inducción de citotoxicidad, estrés oxidativo y sensibilización a radioterapia en cáncer de páncreas (Coleman y cols., 2008). Al igual que la 2-DG, el 3-bromopiruvato (3-BrP), bloquea la producción de ATP mediante la inhibición de la actividad de la enzima hexokinasa (Geschwind y cols., 2002; Ko y cols., 2004; Xu y cols., 2005). La isoforma II (HK-II) se encuentra sobreexpresada en muchos carcinomas (Shinohara y cols., 1991; Mathupala y cols., 1995; Tian y cols., 2005) y unida a la mitocondria (Arora y Pedersen, 1988). Esta enzima tiene un papel central en la regulación de la muerte celular (Robey y Hay, 2006). La eficacia del agente alquilante 3-BrP ha sido demostrada mediante administración intra-arterial directa en la erradicación de tumores de hígado implantados en animales y su efectividad en la inducción de apoptosis ha sido probada con éxito *in vivo* sin aparente toxicidad (Geschwind y cols., 2002; Ko y cols., 2004; Kim y cols., 2007b). Estudios más recientes usando la técnica de FDG-PET han servido para evaluar la actividad antitumoral y biodistribución del 3-BrP en un modelo tumoral en conejo (Park y cols., 2007; Vali y cols., 2008).

Muchos otros compuestos han sido probados como agentes quimioterapéuticos en ensayos preclínicos. Entre los que actúan a nivel de la glucolisis hay que resaltar el iodoacetato (IAA), un conocido inhibidor de la actividad de la enzima GAPDH (Bickis y Quastel, 1965), que ha mostrado ser eficaz como antitumoral en un modelo de ascites (Fahim y cols., 2003). La lonidamina es una molécula que reprime la glucolisis mediante la regulación de la enzima hexokinasa (Floridi y cols., 1981) y potencia los efectos de radioterapia en modelos murinos (Kim y cols., 1986). La gran habilidad de la lonidamina

para suprimir el metabolismo energético de la célula tumoral, así como para potenciar los efectos de otros quimioterapéuticos, ha conducido al diseño de ensayos clínicos (fases II-III) bien en terapia individual o en combinación con otros agentes para el tratamiento de glioblastomas, cáncer de mama, ovario y pulmón (De Lena y cols., 2001; Di Cosimo y cols., 2003; Oudard y cols., 2003; Papaldo y cols., 2003). El inhibidor de la glucólisis, 5-tioglucosa (5-TH) se ha clasificado como agente antineoplásico por su capacidad para bloquear el consumo de glucosa y promover muerte celular bajo condiciones de hipoxia (Kim y cols., 1978; Teicher y cols., 1981; Harrigan y cols., 1992). La somatostatina y su análogo estructural TT-232, interaccionan con la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2). Esta isoforma del enzima se encuentra sobreexpresada en cáncer y, presumiblemente, es responsable de canalizar el piruvato producido por la vía glucolítica a su reducción a lactato fuera del alcance de la mitocondria (Christofk y cols., 2008). Parece ser que la PKM2 se transloca al núcleo en presencia de su inhibidor, siendo esto un estímulo suficiente para la inducción de muerte celular (Stetak y cols., 2007). Se ha estudiado el poder como antitumoral de la manoheptulosa, otro análogo no metabolizable de la glucosa que inhibe la actividad de la enzima glucoquinasa. Este compuesto disminuye el consumo de glucosa y suprime el crecimiento de tumores ascíticos (Board y cols., 1995; Xu y cols., 1995). La glufosfamida, es un agente alquilante que utiliza el sistema de transporte de la glucosa (Seker y cols., 2000) y ha demostrado su eficacia en la erradicación de tumores pancreáticos (Briasoulis y cols., 2003; Dollner y cols., 2004; Giaccone y cols., 2004). El tratamiento con glufosfamida potencia el efector reductor de la gemcitabina en el tratamiento de tumores de páncreas (Ammons y cols., 2007) y, recientemente, estos dos compuestos están siendo usados en terapia combinada en ensayos clínicos en fase III (Chiorean y cols., 2008). Existen otros compuestos que interfieren el metabolismo glucolítico celular aunque todavía no se han probado sus efectos preclínicos como antineoplásicos, entre ellos cabe destacar la α -clorohidrina (Jelks y Miller, 2001) y el ornidazol (Jones y Cooper, 1997), que actúan a nivel de la GAPDH, así como el oxalato (Buc y cols., 1980), que lo hace a nivel de la piruvato quinasa (PK).

Otra estrategia para explotar el metabolismo energético con fines antitumorales es el uso de moléculas que potencien la activación de la función de la mitocondria (Fantin y cols., 2006; Schulz y cols., 2006; McFate y cols., 2008). Estudios muy recientes y novedosos han propuesto al dicloroacetato (DCA), una pequeña molécula que se ha usado en el pasado para el tratamiento de enfermedades metabólicas (Barshop y cols., 2004), como nuevo agente terapéutico contra el cáncer (Bonnet y cols., 2007; Pan y Mak, 2007). Esta molécula es un conocido inhibidor de la PDK (Stacpoole, 1989) y promueve un cambio metabólico en la célula, inhibiendo la glucólisis y activando la oxidación del piruvato en la mitocondria (Bonnet y cols., 2007). Esto produce una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, aumento de los niveles de H_2O_2 y una activación de los canales de potasio, lo que en último término estimula la ejecución de apoptosis y la regresión del

tumor (Bonnet y cols., 2007). Las células adyacentes al tumor no son sensibles a estos efectos ya que no sufren el cambio metabólico en respuesta al DCA (Bonnet y cols., 2007). Recientemente, su eficacia ha sido extendida a otros tipos de tumores, siendo efectivo en la sensibilización de células de cáncer de endometrio (Wong y cols., 2008) y próstata (Cao y cols., 2008) a apoptosis. La larga trayectoria del DCA en el tratamiento de diversas patologías metabólicas ha facilitado la puesta a punto de las dosis óptimas que minimicen sus efectos tóxicos y posibiliten su traslación a ensayos clínicos en pacientes con cáncer. En este sentido, están actualmente en marcha ensayos en fase I para el tratamiento de tumores sólidos y en fase II para el tratamiento de gliomas y glioblastomas (revisado en (Michelakis y cols., 2008)).

Otras moléculas que promueven la actividad pro-apoptótica de la mitocondria mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial han sido propuestas como agentes antitumorales (Galluzzi y cols., 2006). En este sentido, se ha demostrado que el arsenito es capaz de estimular apoptosis mediada por TNF α en melanomas (Ivanov y Hei, 2004, 2005). El ácido betulínico es un triterpeno pentacíclico capaz de inducir apoptosis por vía mitocondrial en células tumorales así como de potenciar el efecto de otros fármacos (Fulda y Debatin, 2005; Kasperczyk y cols., 2005). Los jasmonatos son hormonas de estrés de plantas que inducen la liberación de citocromo c y el hinchamiento mitocondrial en células cancerígenas sin toxicidad aparente en células normales (Rotem y cols., 2005; Goldin y cols., 2008).

La ruta de las pentosas fosfato (PPP) puede limitar la proliferación celular ya que es la vía que proporciona las ribosas necesarias para la biosíntesis de ácidos nucleicos y el NADPH necesario para procesos biosintéticos (Ortega y cols., 2009a). Se ha sugerido que la inhibición de la transcetolasa (TK) puede disminuir la actividad de la enzima GAPDH y por tanto limitar la producción de ATP, NADPH y ribosas que se necesitan para la biosíntesis de macromoléculas (Boros y cols., 1997; Rais y cols., 1999). En este sentido, se ha demostrado cómo un inhibidor irreversible de la TK, la oxitiamina, disminuye el crecimiento del tamaño tumoral tanto *in vivo* como *in vitro* (Boros y cols., 1997; Rais y cols., 1999). Otra molécula que puede interferir con esta ruta del catabolismo de la glucosa es la 6-aminonicotinamida (6-AN) que inhibe la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Su actividad como antitumoral es mediada por estrés oxidativo y en terapia combinada contribuye a la sensibilización de las células cancerígenas a radioterapia y otros fármacos (Budihardjo y cols., 1998; Varshney y cols., 2003; Varshney y cols., 2005).

La progresión del cáncer requiere la biosíntesis de lípidos, componentes esenciales de las membranas biológicas. La enzima multifuncional ácido graso sintasa (*Fatty Acid Synthase-FAS*) se encuentra sobreexpresada en diversos tumores humanos (Milgraum y cols., 1997; Pizer y cols., 2001; Baron y cols., 2004; Kuhajda, 2006; Menendez y Lupu, 2007). En este contexto, la cerulenina, un inhibidor de su actividad enzimática, es capaz

de inducir apoptosis en diversas líneas tumorales (Heiligttag y cols., 2002; Kuhajda, 2006; Okawa y cols., 2008). El inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), sorafenio A, promueve arresto del crecimiento en células cancerígenas (Beckers y cols., 2007). Otra de las moléculas que ha sido testada como antitumoral es el etomoxir, un inhibidor específico de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) que es la enzima cuello de botella que regula la entrada y oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (Hernlund y cols., 2008).

#	Compuesto	Proceso Metabólico	Diana	Fase clínica
1	2-desoxiglucosa	Glucolisis	Hexoquinasa	Fase I/II
2	3-bromopiruvato	Glucolisis	Hexoquinasa	Pre-clínica
3	lonidamina	Glucolisis	Hexoquinasa	Fase II/III
4	5-tioglucosa	Glucolisis	Hexoquinasa	Pre-clínica
5	manoheptulosa	Glucolisis	Glucoquinasa	Pre-clínica
6	iodoacetato	Glucolisis	GAPDH	Pre-clínica
7	α -clorohidrina	Glucolisis	GAPDH	---
8	ornidazol	Glucolisis	GAPDH	---
9	oxalato	Glucolisis	PK	Pre-clínica
10	somatostatina	Glucolisis	PK	Fase I-III
11	dicloroacetato	Oxidación piruvato	PDK1	Fase I/II
12	glufosfamida	Glucolisis/ PPP	Transporte glucosa	Fase I/II/III
13	6-aminonicotinamida	PPP	G6PD	Pre-clínica
14	oxitiamina	PPP	TK	Pre-clínica
15	arsenito	apoptosis	PMEM	Pre-clínica
16	ácido betulínico	apoptosis	PMEM	Fase I/II
17	jasmonatos	apoptosis	PMEM	Pre-clínica
18	sorafenio A	Síntesis ácidos grasos	ACC	Pre-clínica
19	cerulenina	Síntesis ácidos grasos	FAS	Pre-clínica
20	etomoxir	β -oxidación	CPT1	Pre-clínica

Tabla II. Pequeñas moléculas que usan el metabolismo energético de la célula tumoral como diana terapéutica. GAPDH, gliceraldeído 3-P-deshidrogenasa; PK, piruvato quinasa; PDK1, piruvato deshidrogenasa quinasa 1; G6PD, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; TK, transcetolasa; PMEM, permeabilización de la membrana externa mitocondrial; ACC, acetil-CoA carboxilasa; FAS, ácido graso sintasa; CPT1, carnitina palmitoil transferasa 1; PPP, vía de las pentosas fosfato.

1.5. Senescencia y cáncer.

El término senescencia fue acuñado por Hayflick y Moorhead en 1961 para definir la pérdida del potencial proliferativo de fibroblastos en cultivo (Hayflick y Moorhead, 1961). A lo largo de muchos años la senescencia ha sido entendida como “el proceso de envejecer” en respuesta al acortamiento de los telómeros, y definida como *senescencia replicativa* (Harley, 1991; Dimri y cols., 1995; Bodnar y cols., 1998). En la actualidad, se conocen al menos dos estímulos capaces de inducir senescencia celular independiente de telómeros

que hacen referencia a la respuesta de células proliferativas a diferentes estímulos de estrés y/o daño celular: (i) inducida por oncogenes y (ii) por especies reactivas de oxígeno, ambas englobadas dentro de un concepto más amplio denominado *senescencia prematura o SIPS (Stress-induced premature senescence)* (Drayton y Peters, 2002). A pesar de que las células senescentes se mantienen metabólicamente activas, en todos los casos la senescencia va asociada a una serie de cambios en la función y morfología celular tales como, arresto permanente del ciclo en fase G1, incapacidad para sintetizar DNA, morfología alargada y vacuolizada, así como cambios en el perfil de expresión génica (Berube y cols., 1998; Lundberg y cols., 2000). Las células senescentes pueden identificarse por la presencia de marcadores clásicos como la expresión de β -galactosidasa a pH=6 (SA- β -gal) (Dimri y cols., 1995), p16^{INK4A}, p21^{cip/waf1}, PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), fosforilación de H2AX, o activación de CHK1 y CHK2 (Suzuki y cols., 2001; d'Adda di Fagagna y cols., 2003).

Estudios recientes han propuesto la implicación de la senescencia celular en envejecimiento y cáncer (revisado en (Dimri, 2005)). Si bien los mecanismos de su participación en envejecimiento siguen siendo motivo actual de debate, la implicación de proteínas como p53 y Rb en la regulación de este proceso celular (Bringold y Serrano, 2000; Itahana y cols., 2004) ha hecho que la hipótesis de la senescencia como supresor tumoral haya cobrado mucha importancia en los últimos años (Dimri, 2005). Uno de los requisitos para que ocurra la transformación celular es la evasión de senescencia y la subsiguiente adquisición de un fenotipo inmortal (Kondoh, 2008). En este contexto, diversos estudios se han centrado en desenmascarar las vías y/o mecanismos que subyacen al fenotipo senescente. Se conocen diversas rutas de activación de senescencia que culminan en el bloqueo irreversible del ciclo celular, y por tanto, no es de extrañar que la maquinaria molecular que controla y regula la progresión del ciclo celular esté directamente implicada en la ejecución del proceso (Sherr y Roberts, 1999; Bringold y Serrano, 2000).

1.5.1. Senescencia replicativa o dependiente de telómeros.

Los telómeros son esenciales para prevenir la pérdida de información genética así como para la correcta recombinación y segregación de los cromosomas durante el ciclo de división (revisado en (Smogorzewska y de Lange, 2004)). La telomerasa es la enzima encargada del mantenimiento de los telómeros, y su subunidad catalítica (TERT) junto con el componente de RNA (TERC) forman el complejo encargado de sintetizar las repeticiones teloméricas al final del cromosoma. La mayoría de las células somáticas no contienen suficiente enzima para mantener la longitud del telómero (Masutomi y cols., 2003), de manera que se produce un acortamiento del mismo como consecuencia del transcurso normal del ciclo de división. Este acortamiento progresivo de la secuencia telomérica induce la activación de la respuesta a daño en el DNA mediada por p53 y finalmente, la parada del ciclo celular. Por otro lado, esta respuesta celular también se activa por la aparición de

alteraciones en la actividad de la telomerasa (d'Adda di Fagagna y cols., 2003) (Fig. I6).

1.5.2. Senescencia prematura o independiente de telómeros.

El primer estímulo oncogénico que se describió que podía activar un fenotipo de senescencia prematura fue Ras, cuya activación promovía arresto del ciclo celular en G1 y acumulación de p53 (Serrano y cols., 1997). Actualmente se han extendido estas observaciones a otros oncogenes como Raf, Mos, Mek, Myc o ciclina E (Di Micco y cols., 2007; Ozturk y cols., 2008). La expresión de estos oncogenes conduce finalmente a la aparición de daños severos en el DNA (Fig. I6). Actualmente, los mecanismos de inducción de senescencia vía ROS no se conocen en profundidad, si bien es ampliamente aceptado que la producción de daño oxidativo en la célula impacta en las moléculas de DNA (Fig. I6). En todos estos casos el daño que se ejerce en el material genético induce la cascada de señalización que activa a p53 (Fig. I6). Se conocen diversos genes diana de p53 implicados en multitud de procesos celulares (revisado en (Dimri, 2005)). La activación de p53 ocurre de manera progresiva con la acumulación de duplicaciones celulares (Afshari y cols., 1993; Bond y cols., 1996; Bringold y Serrano, 2000) siendo una de sus dianas preferentes el gen p21^{Cip} cuyos niveles se encuentran aumentados en el proceso de senescencia celular (Tahara y cols., 1995; Alcorta y cols., 1996) (Fig. I6). No obstante, estudios recientes han aportado datos acerca de la existencia de una vía de inducción de senescencia mediada por p21^{Cip} de forma independiente de p53, y que cursa con la acumulación de ROS en la célula (Macip y cols., 2002).

Se conocen algunas vías de señalización de senescencia que no se producen por la aparición de un daño directo en el DNA sino que están relacionadas con la regulación de la maquinaria molecular implicada en el control del ciclo celular. Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son parte de esta maquinaria y su actividad se encuentra finamente regulada por un grupo de pequeñas proteínas denominadas inhibidores de CDK o CKI (revisado en (Sherr y Roberts, 1999)) de las cuales se conocen dos familias: INK4 y Cip/Kip. La familia INK4 está compuesta por 4 miembros que son p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D} (revisado en (Ruas y Peters, 1998)) que inhiben específicamente a las quinasas CDK4 y 6. La familia Cip/Kip consta de tres miembros denominados p21^{Cip}, p27^{Kip1} y p57^{Kip}, y se asocian tanto a los complejos CDK4-6/D como a CDK2/E-A (revisado en (Sherr y Roberts, 1999)). Por un lado estabilizan la unión del complejo CDK4-6 y ciclina D y por otro inhiben la asociación entre CDK2 y ciclina E o A, siendo su efecto final dependiente de la cantidad relativa de los diferentes complejos CDKs (revisado en (Bringold y Serrano, 2000)).

Se ha descrito que el locus INK4A contiene un gen solapante denominado ARF que codifica la proteína p19^{ARF} (o p14^{ARF} si nos referimos específicamente a la versión en humanos) (Sherr, 1998). p16^{INK4A} y p19^{ARF} presentan distintos promotores y pautas de lectura, de modo que son dos transcritos codificados como dos proteínas distintas. p19^{ARF} se activa

por acumulación de duplicaciones celulares y estabiliza a p53 participando activamente en la vía de señalización de senescencia p19^{ARF}/ p53/ p21^{Cip} (Fig. I6).

La proteína supresora de tumor retinoblastoma (Rb), es el principal sustrato de los

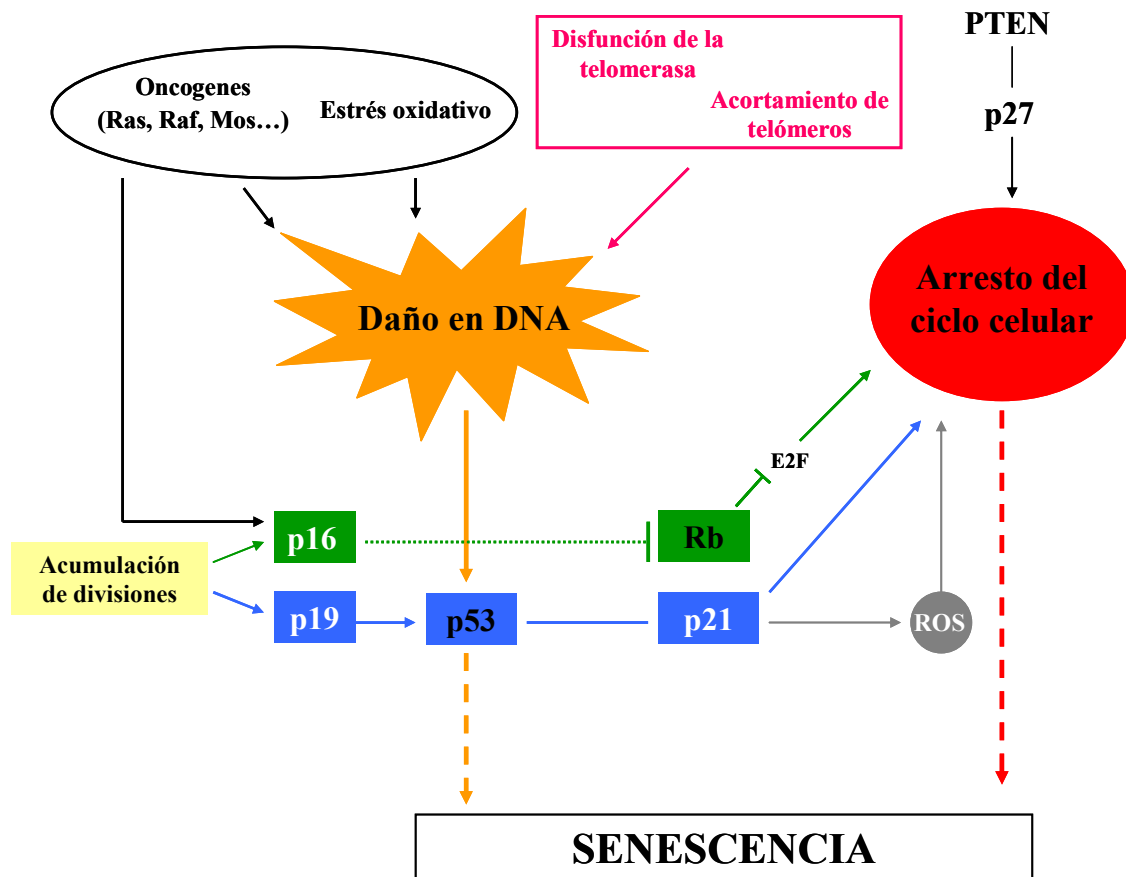


Figura I6. Vías de señalización de senescencia celular. El esquema ilustra los distintos estímulos que culminan con la aparición del fenotipo senescente. Entre los estímulos que producen daños severos en el DNA hay que destacar aquellos definidos como senescencia replicativa o dependiente de telómeros (cuadro en rosa), y los que se engloban dentro de la senescencia prematura o independiente de telómeros (elipse en negro). La activación de la respuesta celular a daño en el DNA es mediada por p53 y culmina con la parada del ciclo celular y aparición de fenotipo senescente. La proteína p53 también se activa por la acumulación de divisiones celulares que promueven la activación de la vía p19^{ARF}/ p53/ p21^{cip} (en azul). Existe un mecanismo adicional de activación de senescencia mediado por la acumulación de p21 de forma independiente de p53 mediada por aumento de ROS en la célula. La acumulación del inhibidor de quinasas p16^{INK4A} promueve el arresto del ciclo celular en G1 impidiendo la fosforilación de Rb y consiguiente liberación del factor de transcripción E2F (en verde). p16^{INK4A} también se acumula en respuesta a estímulos oncogénicos y de estrés oxidativo. La sobreexpresión de PTEN promueve la acumulación del inhibidor de quinasas p27^{kip} arrestando el ciclo celular.

complejos CDK4-6/D. En su estado hipofosforilado permanece asociado a factores de transcripción como E2F silenciando su actividad, y al ser fosforilado se libera de esta unión y promueve la activación de dichos factores (Kaelin, 1999) (Fig. I6). Las CKI de la familia INK4 al inhibir la actividad de las quinasas CDK4 y 6 son responsables de mantener la

proteína Rb en su estado hipofosforilado y por tanto de arrestar eficazmente la progresión del ciclo celular (Bringold y Serrano, 2000). De los miembros mencionados anteriormente, es p16^{INK4A} el que se ha visto inactivado mayoritariamente en tumores humanos (revisado en (Ruas y Peters, 1998)). Una característica especial de esta proteína es que resulta sobreexpresada en respuesta a estímulos de estrés y oncogénicos que inducen senescencia (Bringold y Serrano, 2000) (Fig. I6).

Más recientemente se ha descrito la activación de senescencia celular asociada al supresor tumoral PTEN, una fosfatasa que cataliza la conversión de PIP₃ en PIP₂ (Cantley y Neel, 1999). La pérdida de PTEN es una característica común a muchos tumores humanos (Bringold y Serrano, 2000) y su sobreexpresión se relaciona con la activación de la p27^{Kip1} y la aparición del fenotipo senescente tanto en modelos de fibroblastos murinos (Collado y cols., 2000) como humanos (Wagner y Jansen-Durr, 2000) (Fig. I6).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

La mitocondria desempeña funciones esenciales para la fisiología de la célula por lo que alteraciones de la función mitocondrial están frecuentemente asociadas a diversas patologías, incluido el cáncer. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la función bioenergética de la mitocondria y la muerte celular son dos procesos que están molecular y funcionalmente integrados, lo que ha suscitado el interés por el estudio de la mitocondria en la biología del cáncer. Nuestro grupo ha contribuido significativamente a este desarrollo habiendo sugerido que la mayor glucólisis aeróbica de los tumores y células cancerígenas es el resultado de la pérdida de actividad bioenergética de la mitocondria en la célula tumoral, apoyando abiertamente los postulados originales de Warburg. En esta tesis nos hemos propuesto profundizar en la caracterización de los mecanismos de participación del metabolismo energético de la célula tumoral en la progresión del cáncer.

En base a estos antecedentes nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Regular la expresión de la proteína cuello de botella de la fosforilación oxidativa en células derivadas de carcinoma colorrectal (HCT116) y de hepatocarcinoma (HepG2) con el fin de esclarecer la contribución del metabolismo energético en la progresión de estas neoplasias.
2. Explorar la posible utilidad, vías y mecanismos de actuación de pequeñas moléculas que interfieren con el metabolismo energético de la célula tumoral como diana terapéutica del cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Líneas celulares humanas.

La línea celular **HCT116**, derivada de carcinoma colorrectal humano, fue cultivada en medio McCoy's 5A (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las líneas celulares humanas **HepG2**, derivada de hepatocarcinoma, **HS578T**, **BT549**, **T47D** y **NCI-ADR-res** derivadas de carcinomas mamarios, **CAKI-1** y **A-498**, derivadas de carcinomas renales, **HL-60** y **MOLT4**, derivadas de leucemias, y **A-549**, derivada de carcinoma de pulmón, fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las líneas celulares, **KM12**, derivada de adenocarcinoma de colon, **HOP62**, derivada de carcinoma de pulmón, **SKOV-3**, derivada de adenocarcinoma de ovario, **SKMEL5** y **LOXIMVI**, ambas derivadas de melanomas, y **SF539** derivada de glioma, fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todos los medios fueron complementados con 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina y 400 μ M de aminoácidos no esenciales (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C con 7% CO₂ y un 95% de humedad.

3.1.2. Animales de experimentación.

Se emplearon ratones machos de la cepa Hsd: Athymic Nude-Foxn1_{nu} albinos, descendientes de una colonia obtenida del Instituto Nacional del Cáncer, Frederick, (Maryland, Estados Unidos). Estos animales, además de no tener pelo, son deficientes en linfocitos T maduros y carecen de timo funcional. Los animales se mantuvieron en el animalario del CBM "Severo Ochoa" en celdas estancas dotadas de ventilación y ciclos de luz-oscuridad disponiendo de libre acceso al agua y a la dieta estándar del laboratorio (23% proteínas, 5% lípidos, 40,8% glúcidos, 4% celulosa, 5,7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La humedad osciló entre el 40-50% y la temperatura entre 22-24°C.

3.1.3. Oligonucleótidos.

Se adquirieron 5 U de A_{260nm} de cada oligonucleótido, purificados por HPLC (Invitrogen). El liofilizado se resuspendió a 4°C en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 2 mM) para obtener una concentración final del oligonucleótido de 100 μ M y se conservó a -20°C. La Tabla M1 contiene una lista de los oligonucleótidos que se han usado en este trabajo, incluyendo el proceso en el que se encuentran implicados los genes.

3.1.4. Otros compuestos.

Los inhibidores oligomicina (OL) y 2-desoxiglucosa (2DG), el 5-fluorouracilo (5FU), el dicloroacetato (DCA), 3-bromopiruvato (3-BrP) y el iodoacetato (IAA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Secuencia	Oligo
Fosforilación oxidativa			
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit	β-F1 ATPase	cagcagatttggcagg	I
		cttcaatgggtccaccata	D
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATPAF1	ctaccgcgacaagatccag	I
		tgtctccgaattcactgc	D
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3	ATP5G3	gaggaaagcggagaggag	I
		tggctctgatgcaactcggga	D
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1	ATP5G1	tgttacagggsgtctaaccag	I
		tggagtgaggagttgctgta	D
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F2	ATP5J2	gacaagaaactctggaggtcaa	I
		taggac'tgaagtcgccatc	D
Cytochrome c oxidase subunit VIIb	COX7b	agcgcactaaatcgtctcca	I
		gaaaatcaggggtgtacgtttctgg	D
		gcagtttctggcacatggta	I
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	NDUFAF1	aaatgtaagtttcttcctgggcta	D
Metabolismo mitocondrial y apoptosis			
Apoptosis inducing factor, mitochondrial associated	AIFM1	caagcacgccttaacatctgg	I
		gcgtagcatctggtctctac	D
Aminolevulinate delta synthase 1	ALAS1	cagtaatgaciac'taggatgagtcg	I
		ccatgtgttccaaggtcca	D
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	gaatttc'gaaagtttcttcca	I
		tgttcagacgcctccaat	D
Cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	cyb5B	ggcgagctctacgaltcacc	I
		gctgttcacagcagaacctc	D
Isocytate dehydrogenase 3 NAD+ alpha	IDH3A	tgggggtgcaatttttgagt	I
		ggattcgccaatgctcttg	D
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	GLUD1	cattcatgtattgtccagcagac	I
		gtaagcaaatct'gacagttttaatga	D
Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	PDHB	cggataaggagacagacca	I
		ttatagcatcac'gaactgtcacc	D
Biogénesis mitocondrial			
FK506 binding protein 5	FKBP5	ccaacacgaaggagcaacagt	I
		ccacatct'gacagtcaaca	D
Mitochondrial transcription termination factor	MTERF	ggcggaagtaaaagcgaac	I
		taaggaaaggctc'gcatcc	D
Transcription factor A, mitochondrial	TFAM	ataattaaagctc'agaacccagatg	I
		gaatcaggaggtccctcca	D
Translocase of inner mitochondrial membrana 17	TIMM17A	ggggtggcaattccttagctt	I
		ggggtctctc'gcaactgag	D
Tu-translation elongation factor	TUFM	atgtggaccacgggaagac	I
		ggcatgtc'aatctcctcgta	D

Angiogénesis y respuesta inmune			
Lipocalin 2	LCN2	caggactccacctcagacct	I
Neuropilin 1	NRP1	cacataccactccctggga	D
		tgacagacagtgctcagaag	I
		aagctgfatctggcagaatg	D
		agtgtgcccactgagga	I
Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	ggtaggggttgatcgcata	D
Expresión y reparación de DNA			
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	cagagctgggaacctgaggag	I
		ctgcaagtgggacagctcggg	D
		cccgataaacgtggtgtgt	I
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	agccacatctctgcgcgt	D
		ctaccacacaccccgagact	I
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Fos	aggtccgtgcagaagtctct	D
Biosíntesis de precursores			
Uridine phosphorylase 1	UPP1	aggacactgcctgggaacg	I
		ttcagctttctcgcattgg	D
5'-nucleotidase, ecto (CD73)	Nt5e	caaatacaggacgttattgccata	I
		ttcatctcaaacacataaattgtcc	D
		caagggaagggcattcttggt	I
Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	tcattccacaagtgaattctgc	D
Ciclo celular			
Tumor protein p53	TP53	ctttccacgacgggtgaca	I
		tcctccatgcagtgacc	D
Retinoblastoma	RB1	aatttggaaggacatgtgaacttat	I
		ccaatgcagaattatttcagtagata	D
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	gaggagtcggggagcacag	I
		ctccggattaccctcatcctt	D
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	cgaagtccagttctctgtggag	I
		catgggttcgacggacat	D
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN1B	ccctagaggggcaagtacgagt	I
		agtagaacctggcgaagcig	D
		gagcagcatgggagccttc	I
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	CDKN2A	ccctccgaccgaactatctcg	D

Tabla M1. Oligonucleótidos. En la tabla se indican los nombres de los oligonucleótidos usados en los experimentos de qPCR a tiempo real en este trabajo, el símbolo del gen, así como las secuencias de los oligos derecho (D) e izquierdo (I) en cada caso.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Tratamientos celulares.

En los ensayos de análisis del fenotipo bioenergético, las líneas celulares HCT116 y HepG2, fueron tratadas durante 48 h con 6 μ M de oligomicina (OL) 24h después de su siembra (fenotipo G). El medio con OL se repuso cada 24h. En el caso de la línea celular HCT116, se realizó un tratamiento de 48 h con 10 mM del análogo no-metabolizable de la glucosa 2-desoxiglucosa (2DG) disuelto en el medio de cultivo correspondiente (fenotipo SM). En paralelo se llevaron como control las células sin tratamiento (fenotipo M). El día del experimento se repuso el medio de cultivo sin tratamientos y las células se procesaron para los distintos ensayos.

Los diferentes tipos celulares fueron incubados para posteriores ensayos en ausencia o presencia de 10 μ M de 5-fluorouracilo (5-FU) durante 48 h, 8 μ M de 3-bromopiruvato (3-BrP) y 100 μ M de iodoacetato (IAA) durante 7 h, 1 o 10 mM de dicloroacetato (DCA) durante 24 h y 1 μ M de estaurosporina durante 24 h.

3.2.2. Técnicas de microscopía electrónica.

3.2.2.1. Inclusión convencional en Epon.

Las células se fijaron en 2% de glutaraldehído en tampón Sörensen Na/K 0.1M pH 7,4 durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el fijador y se lavó la placa tres veces con tampón fosfato Na/K pH 7.4. Las células se obtuvieron mediante raspado de la placa de cultivo tras el último lavado añadiendo el volumen apropiado de tampón. La suspensión celular se centrifugó a 3000xg durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó con PBS y posteriormente se fijó con 1% OsO₄ (tetróxido de osmio) y 1% K₃Fe(CN)₆ (ferrocianuro potásico) durante 60 min. A continuación, las células se deshidrataron con etanol y se embebieron en Epon (resina TAAB 812, TAAB Laboratories Equipment Limited) siguiendo los protocolos estándar. Se obtuvieron criosecciones ultrafinas, de 70-80 nm de espesor, a -120°C en ultramicrotomo LeicaUCT (Leica microsystems). Los cortes se recogieron en gradillas de cobre cubiertas de carbono coloidal, se tiñieron con 2 % acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron a 80 kV en un microscopio electrónico Jeol 1010 (Tokyo, Japan).

3.2.2.2. Criosustitución e inclusión en Lowicryl.

Las células se fijaron en 4% de paraformaldehído en tampón fosfato Sörensen 0.1M pH 7,2 durante 2 h a 4°C, siendo conservadas en 0,1% paraformaldehído en tampón fosfato 0.1M hasta su inclusión. A continuación, las muestras fueron crioprotegidas en glicerol al 30%, criofijadas por inmersión en propano líquido y finalmente criosustituidas en metanol a -85°C. Las muestras celulares se embebieron en Lowycril HM20 (Polysciences, Inc. Warrington, P.A) según el protocolo descrito por la casa comercial. Se obtuvieron cortes ultrafinos en ultramicrotomo LeicaUCT (Leica microsystems) y se colocaron en gradillas

de níquel. Las secciones se contrastaron con 2 % acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron a 80 kV en un microscopio electrónico Jeol 1010 (Tokyo, Japan).

3.2.2.3. Inmunomarcaje.

El inmunomarcaje se llevó a cabo sobre cortes en rejillas de cada una de las muestras con el siguiente protocolo: tras bloquear con 1% BSA en PBS durante 5 min, se incubó con el primer anticuerpo (anti- β F1- ATPasa) (Cuezva y cols., 2002) diluido 1/50 en medio de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó durante 1h con 0,08 U de A_{525nm} del complejo proteína A-oro coloidal de menor tamaño (10 nm) diluido en PBS suplementado con 1% BSA, 0,075% Tritón X-100, 0,075% Tween 20 y 0,02% NaN_3 durante 45 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras lavar el exceso de anticuerpo, se incubó 30 min con 0,1 mg/ml de proteína A en PBS para saturar los sitios de unión del primer anticuerpo a la proteína A. Posteriormente, se repitió el mismo proceso con el segundo anticuerpo (anti-Hsp60 (SPA 805), dilución 1/25), que se incubó con 0,4 U de A_{525nm} del complejo proteína A-oro coloidal de mayor tamaño (15nm). Por último, las muestras se fijaron con 1% glutaraldehído en PBS y se contrastó 7 min con acetato de uranilo y 45 s con citrato de plomo. En paralelo se realizaron la serie de controles clásicos para comprobar la especificidad de la señal inmunoreactiva. Las muestras se observaron en un microscopio Jeol 1010 (Tokio, Japón) a 80 KV. Las técnicas de inclusión, corte, inmunomarcaje, procesamiento y fotografiado de las muestras analizadas fueron realizadas en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

3.2.2.4. Procesamiento y cuantificación de imágenes.

El análisis de las imágenes adquiridas se realizó con el programa Image J (*Image processing and analysis in Java*). Este software aplica la herramienta “integrated density” para detectar la intensidad de gris en un área definida por el usuario. Así, el parámetro “densidad relativa de la matriz” se determinó mediante el cociente entre la media de intensidad del gris en la mitocondria (I_M) respecto al citoplasma (I_C). El cálculo de la “longitud relativa de las crestas” se llevó a cabo en imágenes digitales midiendo la longitud de las crestas (l_C) respecto a la sección transversal de las mitocondrias (ancho) (a_M) en píxeles. La misma herramienta informática se usó para la conversión de las medidas en píxeles en unidades de longitud (μm).

3.2.3. Análisis metabólicos.

3.2.3.1 Determinación del flujo glucolítico.

La determinación del flujo glucolítico se realizó midiendo la velocidad inicial de formación de lactato mediante la determinación de la concentración de este metabolito presente en el medio de cultivo. El método se fundamenta en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD^+ con la consiguiente formación de NADH, cuya concentración se determina espectrofotométricamente a una

longitud de onda de 340nm. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato (Lopez-Rios y cols., 2007). En todos los casos, las células fueron sembradas a tal densidad que en el día del experimento alcanzasen el 60% de confluencia. Ese día, tras reponer el medio de cultivo, se tomaron alícuotas de 100µl del mismo a distintos tiempos según la cinética de acumulación del lactato de cada línea celular. Las muestras se desproteinizaron precipitando con ácido perclórico al 6% (4 volúmenes) y posteriormente se neutralizaron en presencia de indicador universal. Se mezclaron en la cubeta de reacción 200 µl de agua, 500 µl de la mezcla de reacción (Glicina 1M, Hidracina-SO₄ 0,4M, EDTA 1,3mM, NAD⁺ 7,5mM, pH=9,5) y en último lugar 300 µl de muestra y se realizó una prelectura a 340nm en el espectrofotómetro (E₀). A continuación, se añadieron 10 µl de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 40 minutos (E₁). Se calculó la concentración de lactato expresado como nmoles de lactato producido por µg de proteína y hora aplicando la ley de Lambert-Beer ($E_1 - E_0 = C \cdot l \cdot \epsilon$).

3.2.3.2. Medida del consumo de oxígeno en células pegadas.

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la acidificación extracelular (ECAR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). El instrumento mide en tiempo real el consumo de oxígeno así como la extrusión de protones. Durante el ensayo, los niveles de analitos se miden hasta que la concentración de oxígeno desciende a 30mmHg y el pH declina a 0.4 unidades de pH. Las medidas se realizan en placas de 24 pocillos estériles especiales que contienen los dos biosensores fluorescentes (O₂ y pH) así como cuatro puertos diferentes por pocillo útiles para permitir la inyección secuencial de diferentes compuestos (Fig. M1a). Los biosensores del aparato se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una ganancia única del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de calibrado en una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocido.

Las células se sembraron a una densidad de 15-20.000 células por pocillo en un volumen final de 250µl de medio de crecimiento, y se incubaron durante 24h a 37°C y 7% CO₂. Para asegurar la correcta distribución de las células se realizó un protocolo especial de plaqueo en dos pasos como se describe en la Figura M1b. El día del experimento el medio se sustituyó por el volumen apropiado de medio de cultivo sin tamponar. Las células se dejaron en una estufa a 37°C durante un tiempo no inferior a 1hora con objeto de que, tanto la temperatura como el pH, alcanzasen el equilibrio. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron como picomoles de oxígeno consumido por minuto y la acidificación extracelular en unidades de mili-pH por minuto.

3.2.3.3. Determinación del consumo de oxígeno en células en suspensión.

El consumo de oxígeno de las células también se determinó usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark empleando una cubeta de 2 ml a 30°C (Valcarce y cols., 1988). Para ello, las células se recogieron por tripsinización con una solución 0,25% Tripsina-0,02%

EDTA, se lavaron en PBS y se resuspendieron en 200 μ l de medio de respiración (Sacarosa 225mM, KCl 10mM, EGTA 1mM, H_2KPO_4 10mM, $MgCl_2$ 5mM, TrisKCl 10mM pH 7 y BSA 0,05%) suplementado con succinato 8mM justo en el momento de ser añadidas a la cubeta de reacción. Se registró la respiración basal durante al menos 2 minutos. A continuación, se añadió oligomicina 6 μ M y finalmente FCCP 2 μ M. Los parámetros respiratorios medidos se expresaron como nmoles de oxígeno consumidos por minuto y por millón de células.

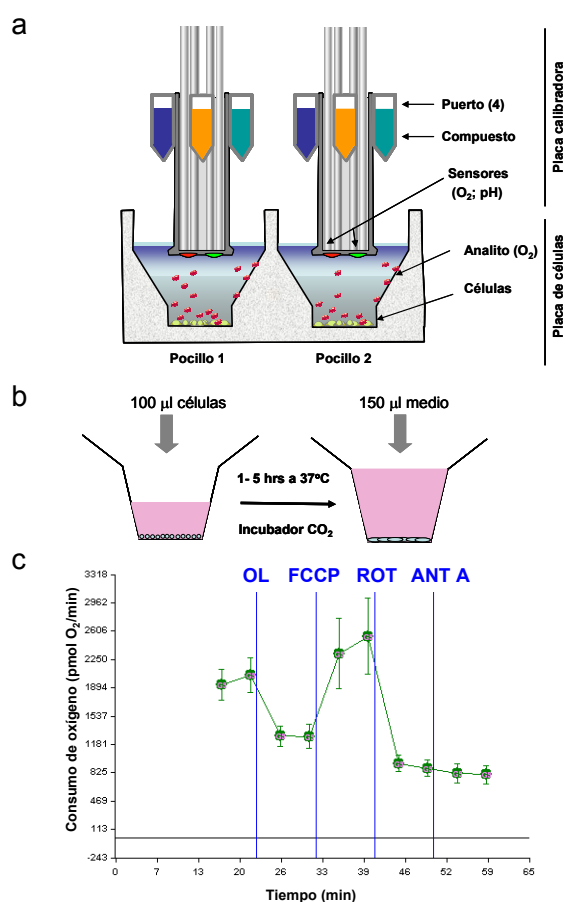


Figura M1. XF24 Seahorse Biosciences.

La figura proporciona una visión esquematizada del funcionamiento de analizador XF24 (Seahorse Biosciences) así como del protocolo de siembra seguido. Las células se reparten en placas especiales (Seahorse Biosciences) de 24 pocillos con una superficie útil de cultivo correspondiente a placas de 96 (0.5 cm²). Las placas calibradoras (Seahorse Biosciences) están provistas de dos biosensores (botones rojo y verde) que permiten la detección del O₂ y pH en células vivas; así como de 4 puertos para la inyección de compuestos distintos de forma consecutiva en los pocillos (a). Para asegurar la óptima distribución de las células se realiza un protocolo de siembra en dos pasos. En primer lugar se plaquea la suspensión celular en un volumen de 100 μ l y se depositan en el incubador entre 1-5 horas a 37°C para permitir su adhesión a la placa. Finalmente, se añaden 150 μ l de medio de cultivo hasta un volumen final de 250 μ l (b). En (c) se muestra un ejemplo ilustrativo del perfil de consumo de oxígeno de una línea celular tras la inyección de los 4 puertos A-D (líneas horizontales en azul): A (6 μ M OL), B (2 μ M FCCP), C (1 μ M Rotenona, ROT), D (1 μ M Antimicina A, ANT A).

3.2.4 Medida de la viabilidad celular.

Las células se recogieron por tripsinización y fueron lavadas con PBS. Alícuotas de la suspensión celular se tiñeron con el colorante azul de tripano (1:1). El azul de tripano es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana de forma que aquellas que adquieren un color azul son consideradas células no viables. El número de células vivas, capaces de excluir el colorante, se determinó al microscopio usando un contador manual y una cámara de Neubauer. Además, como medida de la proliferación celular, también se determinó la concentración de proteína de las

muestras según se describe en el apartado 3.2.8. Para la estimación del parámetro “índice de crecimiento celular” se aplicó la fórmula $\log_2 (C_R/C_S)$, donde “ C_R ” representa el número de células recogidas y “ C_S ” el número de células sembradas.

3.2.5. Estudios de citometría de flujo.

3.2.5.1. Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio.

Este método se basa en la tinción del DNA con yoduro de propidio, compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de DNA emitiendo fluorescencia, de tal modo que la intensidad de la misma es proporcional a la cantidad de DNA de la célula. La fijación previa de las células permite que el yoduro de propidio penetre en todas ellas y que éste pueda ser cuantificado por citometría de flujo. Esta tinción tiene una doble aplicación: por una parte permite analizar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, y por otra, el porcentaje de células apoptóticas (subG1), ya que, como consecuencia de la fragmentación del DNA aparece un pico de células hipodiploide (Darzynkiewicz y cols., 1992). Las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. Con el fin de no perder aquellas células que se habían despegado de la placa como consecuencia del proceso de apoptosis, también se recogió el medio de cultivo. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que se centrifugó a 500xg durante 5 min y a 4°C. El sedimento celular se lavó con PBS y tras resuspender las células en PBS frío, se fijaron añadiendo la cantidad correspondiente de etanol absoluto (a -20°C) para dejarlo al 70%. La suspensión celular se mantuvo a -20°C no menos de 12h. Para la tinción con yoduro de propidio se centrifugaron a 900xg y a 4°C durante 5 min. El sedimento celular se lavó 2 veces en PBS frío y las células se resuspendieron en 300 µl de PBS con RNAsa A 100 µg/ml y yoduro de propidio 50 µg/ml a temperatura ambiente y se incubaron 30 min a 37°C. Tras la incubación, se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

3.2.5.2. Análisis de la muerte celular por tinción con AnexinaV-FITC.

En células vivas la fosfatidil-serina es transportada al interior de la bicapa lipídica por la enzima aminofosfolípido translocasa dependiente de Mg-ATP. En fases tempranas del proceso apoptótico este fosfolípido queda expuesto en la cara externa de la membrana plasmática. Las anexinas constituyen un grupo de proteínas que se unen a fosfolípidos de membrana de forma calcio-dependiente. Este método se fundamenta en la unión entre el conjugado fluorescente AnexinaV-FITC y la fosfatidil-serina por un lado, así como en la unión del yoduro de propidio al DNA en aquellas células que se encuentran en fases más tardías del proceso de muerte celular por otro (Pigault y cols., 1994). La anexina es detectada por citometría de flujo como fluorescencia en el canal del verde, mientras que el yoduro de propidio se detecta en el canal del rojo

Tras los distintos tratamientos la suspensión celular se centrifugó a 500xg durante 5 minutos y las células se resuspendieron en 500 µl del tampón de unión (100mM HEPES/NaOH, 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂, pH. 7.5), se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con AnexinaV-FITC (50µg/ml) y yoduro de propidio (100µg/ml) protegidas en todo momento de la luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

3.2.5.3. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno.

Las células (5x10⁵) sometidas a los distintos tratamientos se resuspendieron en 300 µl de PBS con la sonda di-acetoximetil ester del 6-carboxi-diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) a una concentración de 5 µM. Este análogo, después de la oxidación e hidrólisis por las esterasas intracelulares forma carboxi-diclorofluoresceína, que al tener cargas negativas adicionales impiden su difusión fuera de la célula. La oxidación posterior por el peróxido de hidrógeno da lugar al compuesto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que puede ser detectado por citometría de flujo a una longitud de onda de 534 nm de emisión al ser excitado con una longitud de onda de 510 nm. Las muestras se incubaron con esta sonda durante 30 minutos a 37°C y se lavaron una vez con PBS (Panaretakis y cols., 2001). Para detectar y descartar la proporción de células muertas se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 1µg/ml. Inmediatamente después las muestras se analizaron en citómetro de flujo. Siempre se llevó en paralelo, como control, células sin incubar con la sonda para analizar el tamaño y morfología celular.

3.2.5.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó el catión lipofílico TMRM⁺, tetra metil rodamina metil ester (Molecular Probes). Las células sometidas a diferentes tratamientos se incubaron en placa con la sonda diluida en el medio de cultivo a una concentración final de 0,5 µM durante 10 minutos a 37°C. A continuación se lavaron dos veces con PBS y se recogieron por tripsinización. Asimismo, siempre se analizó en paralelo una alícuota de células incubadas en ausencia de sonda para estudiar la morfología y el tamaño celular. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

3.2.6. Análisis de la muerte celular por microscopía de fluorescencia.

El sedimento de las células tratadas con distintos agentes inductores de muerte (5-FU, 3-BrP, IAA o DCA) se lavó con PBS e incubó con Hoechst 33342 (1mg/ml) y yoduro de propidio (1mg/ml) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron nuevamente con PBS y tras centrifugar a 500xg, el sedimento celular se extendió sobre un portaobjetos. Las preparaciones se observaron con un microscopio Leica DM-IRB (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con tres filtros (verde, rojo y triple) utilizando excitación UV.

3.2.7. Determinación de actividad β -galactosidasa.

La senescencia celular juega un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular. Una característica clásica del fenotipo senescente es la inducción de la actividad β -galactosidasa, definida como senescencia-asociada a β -galactosidasa (SA- β -gal). Dicha actividad se determinó empleando el *Kit* de Senescencia Celular (*Chemicon*). El método se basa en la detección de actividad β -galactosidasa en células en cultivo, mediante la hidrólisis de X-gal. Esta reacción, resulta en la acumulación de gránulos de color azul en las células senescentes. Para ello, las células se lavaron una vez en placa con PBS y se fijaron con el volumen apropiado de solución de fijación (No. 2004755 del Kit Chemicon) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces con PBS y se añadió la solución de detección de SA- β -gal (No. 2004752 del Kit Chemicon) preparada en el momento. Las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.8. Extracción y cuantificación de proteínas.

Para la extracción de proteína total a partir de cultivos celulares, las células se lavaron y se despegaron de la placa como se ha indicado anteriormente. El sedimento celular obtenido se resuspendió en tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 130 mM y Tritón X-100 al 1%). Los tubos se agitaron durante 10 segundos con un “vórtex” y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron en la cámara fría durante 15 min a 11000xg. El sobrenadante, conteniendo las proteínas, fue almacenado a -70°C. Para la extracción de proteína a partir de tumores se pulverizó el tejido en un mortero con N₂ líquido y se extrajo la proteína con tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM Na Cl, 1% Tritón X-100 1%, 1mM DTT, 0,1% SDS, 0.4mM EDTA pH 8, cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas). Los extractos se centrifugaron a 15000x g durante 30 min y a 4°C. Los sobrenadantes se conservaron en pequeñas alícuotas a -70°C hasta su correspondiente análisis. La concentración de proteínas de los extractos biológicos se determinó mediante el reactivo de Bradford (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

3.2.9. Fraccionamiento electroforético de proteínas y *Western blot*.

3.2.9.1. Electroforesis de proteínas mono-dimensionales.

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La calibración de los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas de peso molecular conocido: 200, 97, 66, 45, 30, 21.5, y 14.3 kDa (Rainbow mix RPN 756, Amersham).

3.2.9.2. Electroforesis de proteínas bi-dimensionales.

El análisis de proteínas en dos dimensiones (2D) se llevó a cabo empleando el

Immobiline DryStrip Kit desarrollado por Görg y col. (1988) y suministrado por Pharmacia-LKB de acuerdo a las instrucciones del proveedor y con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Flores y Cuezva, 1997). Para la primera dimensión se emplearon los geles deshidratados *Immobiline DryStrip* de 110 x 3 mm y 0,5 mm de grosor que contienen un gradiente de pH inmovilizado en el rango de de 3-10. Estos geles se rehidrataron en urea 8 M, Tritón X-100 0,5%, DTT 1,3 mM y Pharmalyte 3-10 0,005% (v/v), antes de la aplicación de las muestras. El isoelectroenfoque, siempre a una temperatura constante de 20°C, se llevó a cabo a 300 V durante 1 hora y a 1400 V durante 17 horas. Una vez finalizada la primera dimensión, los geles fueron congelados a -70°C hasta su uso. Para la realización de la segunda dimensión, los geles fueron descongelados y equilibrados durante 15 min en cada uno de los siguientes medios: i) 25-100 mg de DTT por cada 10 ml de solución: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, urea 6M, glicerol 26% y SDS 1%; ii) 0,45 g de iodoacetamida por cada 10 ml de la misma solución descrita anteriormente. Posteriormente los geles fueron cargados sobre geles de poliacrilamida del 12,5% de 14x13 cm y 0,75 mm de espesor. La segunda dimensión se llevó a cabo como se describe a continuación.

3.2.9.3. Electroforesis Blue Native de complejos de membrana en condiciones nativas.

La electroforesis bi-dimensional azul nativa en geles de poliacrilamida (BNPAGE) se realizó según el método descrito por Schägger (Schagger y von Jagow, 1991). Es una técnica que permite separar los complejos mitocondriales funcionalmente activos en una primera dimensión. A continuación las distintas subunidades de dichos complejos se separan en una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes. Para la preparación de los complejos mitocondriales se partió de células HepG2 en cultivo. El sedimento de mitocondrias obtenido se resuspendió en 125 µl de tampón de solubilización (0,5 % Triton, 30 mM Hepes/HCl, 150 mM acetato potásico, glicerol al 10%, 1 mM EDTA, 2 mM de ácido 6-aminocaproico, inhibidores de proteasas) y se incubaron en hielo 10 minutos. A continuación se centrifugó durante 30 minutos a 40,000g a 4°C. El sobrenadante se recogió y se añadió el volumen apropiado de tampón de carga (750 mM de ácido 6-aminocaproico, 5 % Serva Blue G-250 (Serva)). Para la primera dimensión se realizaron geles *blue native* con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida utilizando separadores de 1,5 mm. Las muestras de proteína mitocondrial se cargaron utilizando como ánodo el tampón (25 mM imidazol; pH 7.0) y como cátodo el tampón (7.5 mM imidazol/50 mM tricina a pH 7.0, y 0,01 % de Serva Blue G-250). Las proteínas se separaron a 30V durante 30 minutos y a 70V hasta que el frente de Azul de *Coomassie* saliera del gel. A la mitad de la electroforesis se cambió el tampón del cátodo por el mismo sin Serva Blue G-250, para eliminar el exceso de azul de los geles. Para la segunda dimensión se incubó el gel con una solución desnaturalizante (1% SDS, 1% β-mercaptoetanol) durante 1h. El exceso de solución desnaturalizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es crucial dado que el β-mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel separador de la segunda dimensión. Se montó el sistema de electroforesis usando cristales con separadores

de 0,75mm. El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/bisacrilamida y 0,1% de SDS, y el gel concentrador al 4%. Las proteínas se separaron a 40V durante toda la noche a 4°C. El protocolo de transferencia e incubación con los anticuerpos correspondientes se describe en 3.2.9.5.

3.2.9.4. Tinción de proteínas.

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) durante 2-8 horas. La eliminación del exceso de colorante no unido a proteína se realizó mediante difusión de éste en una solución de ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 25% (v/v), seguida de una incubación de 12-48h con una solución de destinción lenta (Metanol 5%, Acético 7,5%) y conservándolo finalmente en solución de almacenamiento (Acético 1%) a 4°C.

3.2.9.5. Western blot.

Las proteínas fraccionadas en geles mono- o bidimensionales se transfirieron a membranas de PVDF (0,45 µm de poro) mediante electro-transferencia húmeda o semiseca. Para la transferencia semiseca se utilizó un equipo de Pharmacia-LKB empleando una intensidad de corriente de 1 mA/cm² de superficie de gel y en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v) y 0,0375% SDS) durante 90 min a temperatura ambiente. Para la transferencia húmeda se utilizó un equipo Mini Trans Blot® de Bio-Rad y en el mismo tampón de transferencia pero sin SDS. En este caso la transferencia se efectuó a 100V durante 45 min. A continuación las membranas se bloquearon con leche desnatada liofilizada al 5% (p/v) diluida en TBS (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) más 0,1% Tween-20 durante al menos 1 hora con agitación y a temperatura ambiente.

La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1 hora o a 4°C durante toda la noche, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis y sus diluciones se resumen en la Tabla M2. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS más albúmina bovina al 3%. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween (0,1%). Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology, 1:3000), en solución de bloqueo. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECL™ (Amersham) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el software Kodak Digital Science 1D.

Antígeno	Peso molecular	Origen	Productor	Utilidad
β-F1-ATPasa	52kDa	Conejo	Nuestro laboratorio	WB (1:25,000); M.E (1:50)
α-F1-ATPasa	55kDa	Ratón	Molecular Probes	WB (1:1,000)
Hsp60	60kDa	Ratón	Stressgene	WB (1:5,000); M.E (1:25)
PDH	41kDa	Ratón	Molecular Probes	WB (1:500)
IF1	12kDa	Ratón	Molecular Probes	WB (1:500)
GAPDH	35kDa	Ratón	Abcam	WB (1:20,000)
LDH	35kDa	Cabra	Abcam	WB (1:1,000)
PK	60kDa	Cabra	Abcam	WB (1:1,000)
Bax	21kDa	Ratón	Santa Cruz	WB (1:500)
Bcl _{XL}	32kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:500)
Rb	110kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
p53	53kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
p21	21kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:100)
p16	16kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:500)
α-tubulina	60kDa	Ratón	Sigma	WB (1:1,000)

Tabla M2. Anticuerpos empleados en este trabajo. En la tabla se indica el antígeno que reconoce el anticuerpo, peso molecular aparente que muestra en SDS-PAGE, el origen del anticuerpo, la compañía donde fue adquirido o en su caso el laboratorio donde fue generado, así como la utilidad que se les ha dado en esta tesis y la dilución empleada. WB, *western blot*; ME, microscopía electrónica.

3.2.10. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó el “Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit” (Chemicon Internacional). El método se basa en la detección y cuantificación de proteínas modificadas por radicales libres de oxígeno. Estas modificaciones tienen como consecuencia la introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas que se derivan a DNP-hidrazona por la reacción con DNPH. Las muestras de proteína derivadas a DNP se separan en geles de poliacrilamida seguido del protocolo habitual de *Western blot*. Para ello, el sedimento celular de las células sometidas a distintos tratamientos se lavó con PBS y se extrajo la proteína como se describe en el apartado 3.2.8. A continuación, se llevó a cabo la derivación de las proteínas celulares (20 µg) mediante la incubación con dinitrofenilalanina (DNPH) durante 30 minutos. Las muestras proteicas así derivadas se fraccionaron en geles al 12% y se procesaron mediante *Western-blot*. Junto a las muestras derivadas se fraccionaron muestras control sin derivar. El anticuerpo primario utilizado fue anti-DNP a una dilución 1:500 y el secundario 1:300 siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.11. Proliferación tumoral en ensayos con ratones desnudos “nude”.

Para la implantación de células tumorales en ratones desnudos se utilizaron machos de 6 semanas de edad. Los ratones se inocularon subcutáneamente con 10 millones de células HCT116, en un volumen de 100 µl de PBS en el flanco posterior derecho del animal. Se practicó una inspección visual de los animales al menos tres veces por semana. Una vez que los tumores resultaron visibles y palpables, el tamaño de los mismos se registró de forma manual con un calibre estándar. Se realizaron en todos los casos dos medidas de cada tumor: ancho y largo. El volumen de los tumores generados se calculó siguiendo la fórmula $0.52 \times (a^2 \times l)$, donde “a” representa dimensión más corta y “l” la más larga (Govindarajan y cols., 2007). Por condicionantes éticos y con objeto de aliviar el sufrimiento de los animales, en los ensayos de crecimiento tumoral los animales fueron sacrificados por dislocación cervical una vez que el tumor hubo alcanzado un tamaño aproximado de 3,000 mm³. En último término, aquellos animales que no alcanzaron dicho volumen continuaron el seguimiento durante un tiempo no superior a 50 días, momento en el cual fueron sacrificados. Los tumores fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio de los animales y congelados hasta su procesamiento.

3.2.12. Tratamiento antitumoral de los animales.

Para estudiar el efecto de distintos agentes en el crecimiento de los tumores un grupo de 40 animales se inocularon como se describe en el apartado anterior. Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen aproximado de 1,000 mm³, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cinco grupos distintos en función del tratamiento empleado.

El grupo 0 (grupo control) recibió 100µl de solución NaCl 0.9%.

El grupo 1, 100µl de una solución de 3-BrP (8 µM).

El grupo 2, 100µl de una solución de 5-FU (0,5mM).

El grupo 3, 100µl de una solución de DCA (1mM).

El grupo 4, 100µl de una solución de IAA (100 µM).

Todos los tratamientos se realizaron mediante inyección diaria intraperitoneal por un período de 6 días consecutivos. Durante este tiempo, el tamaño de los tumores fue medido a diario con un calibre.

3.2.13. Análisis de la expresión génica por microarrays de DNA.

El procesamiento de las muestras, incluyendo la extracción, purificación, e hibridación, así como el análisis bioinformático extenso se realizó en la empresa Progenika Biopharma S.A (Derio- Vizcaya, España). Se analizaron muestras de células HCT116 con fenotipo M y G. Asimismo, se analizó el transcriptoma de los tumores resultantes de estos dos tipos celulares (T-M y T-G).

3.2.13.1. Síntesis de cRNA biotinilado.

El RNA de las muestras analizadas (células y tumores) se extrajo utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen) y se homogenizó en las columnas QIashredder (Qiagen). Cada muestra de RNA se recuperó en un volumen de 35µl de agua. La calidad y cantidad del RNA se estimaron en un gel de agarosa así como por espectrofotometría. La síntesis de cRNA biotinilado se realizó a partir de 2µg de cada una de las muestras. El cDNA se sintetizó usando el One-Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix), y siguiendo el protocolo del Expression Analysis Technical Manual de Affymetrix. A partir de este cDNA se sintetizó cRNA siguiendo el protocolo del IVT Labeling kit de Affymetrix. A continuación, se purificó con el GeneChip Sample Cleanup Module de Affymetrix, recuperándose en un volumen de 22µl de agua. Finalmente, se fragmentaron 15 µg del cRNA para preparar las mezclas de hibridación.

3.2.13.2. Hibridación y escaneado del Human Genome U133Plus 2.0 array.

Los biochips de DNA son matrices bidimensionales formadas por una serie de sondas de DNA ordenadas en un soporte sólido que hibridan con los cRNAs derivados de las muestras que se analizan. El marcaje de estas moléculas bien por métodos enzimáticos, o bien por métodos fluorescentes, permite identificar y cuantificar el RNA presente en las muestras al hibridar con las sondas de la micromatriz. La inspección visual de los arrays proporciona una idea general de la calidad del experimento. Puede considerarse como válida una imagen con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes, mientras que una muestra problemática por mala hibridación o incorrecta adquisición por el escáner resulta en señales elevadas de fondo. Una vez observadas las imágenes de cada chip, se valoró la calidad de las mezclas de hibridación mediante dos parámetros: la presencia de los “*spike controls*” y la relación 3’/5’ de los genes *housekeeping*. Los “*spike controls*” son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación. La presencia

de estos controles indica que los procesos de hibridación, lavado, revelado y escaneado han resultado correctos. Los “*spike controls*” que se utilizaron fueron BioB, BioC, BioD y Cre. El BioB es el control menos representado en la mezcla, por lo que es el principalmente utilizado para valorar la sensibilidad del experimento. Los controles *housekeeping* son sondas para genes expresados constitutivamente en todo tipo de tejidos. Se encuentran en el array sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' indica la integridad de los cRNAs sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del RNA original utilizado para la síntesis. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del RNA y cRNA sintetizado. En función del órgano de procedencia de la muestra y del tratamiento aplicado, y dado que las condiciones no siempre son las ideales, es difícil obtener un cRNA totalmente íntegro, por lo que el criterio para considerar un experimento como satisfactorio (siguiendo las recomendaciones de Affymetrix), es que la relación 3'/5' no debe superar el valor de 3. Por otra parte, el carácter constitutivo de los genes representados como *housekeeping* no siempre se cumple para todo tipo de tejidos o condiciones experimentales. Así, entre los genes representados en el array, el que más frecuentemente se comporta como verdadero *housekeeping* es GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

3.2.13.3. Escalado y normalización de las matrices.

Como paso previo a la comparación de las matrices se llevó a cabo el escalado de los datos de cada array, con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra o la hibridación. Usando el “software” de Affymetrix GCOS 1.4, se escalan las matrices definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. GCOS calcula la intensidad media de todo el array promediando los valores de intensidad de todos los grupos de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. A continuación, la intensidad media se multiplica por un factor de escalado que la convierte en el valor definido por el usuario (en este caso 100). En la medida de lo posible el factor de escalado de los arrays del mismo experimento debe ser próximo entre ellos y cercano a 1. Para valorar la consistencia de los datos obtenidos se obtuvieron gráficas de dispersión que revelaron una distribución normal en forma de cohete (“*rocket layout*”) típica de los estudios de expresión génica (datos no mostrados). Esto se debe a que un alto número de genes se expresan a nivel muy bajo y el número de transcritos disminuye exponencialmente a medida que aumenta la intensidad de la señal, confirmando así la consistencia de los datos resultantes del análisis. La hibridación, revelado y escaneado de los chips, así como el análisis de los resultados se realizaron siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por Affymetrix Inc ([www. Affymetrix.com](http://www.Affymetrix.com)).

3.2.13.4. Análisis bioinformático.

Se analizaron los resultados de expresión génica obtenidos a partir de 6 muestras de RNA procedentes de líneas celulares humanas (Partek I suministrado en soporte digital)

y 6 muestras de RNA de tejido tumoral (Partek II suministrado en soporte digital) bajo 2 condiciones experimentales. Se utilizó para ello el GeneChip® HG-U133_Plus_2 que interroga a 54,675 secuencias. Así, se obtuvieron listas de sondas que presentan diferencias de expresión entre las muestras comparadas (con un valor de significación p , que por defecto es seleccionado como 0.05). Para el cálculo de la tasa de cambio de expresión entre las distintas condiciones, se seleccionó como condición basal o línea base la condición que se encuentra en segundo lugar en la comparación (el Material suplementario A1 en el Anexo I contiene más detalles acerca del proceso de normalización de las matrices y procesamiento de los datos).

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Partek Genomics Suite v 7.3.1 que asigna un p -valor a cada secuencia tras la aplicación del test estadístico. Cuanto más bajo es este parámetro, más significativa es la diferencia de expresión entre las condiciones a efectos estadísticos. El programa de análisis proporciona un valor de cambio de expresión (“*fold change*”) de cada secuencia respecto a la línea base considerada, que en nuestro estudio es la media geométrica de la condición M en el estudio de células o de la condición TM en el estudio de los tumores. Así, un mayor valor absoluto (con signo negativo para las secuencias reprimidas y signo positivo para las sobreexpresadas) se interpreta como una mayor tasa de cambio. Cuando se buscan diferencias significativas entre varias condiciones, algunas secuencias pueden aparecer como significativas por azar, es decir, ser falsos positivos. Se aplicaron diferentes test de corrección múltiple con objeto de disminuir de forma más rigurosa la probabilidad de aparición de estos errores. En el caso en el que se pudo, se aplicó el test de corrección múltiple más restrictivo de Bonferroni, que estima que 0.05 secuencias pueden haber salido por azar, mientras que en el caso que es aplicable Benjamini y Hochberg (FDR) se espera que un 5% de los genes aparecidos como significativos puedan ser producto del azar. En las circunstancias en las que no procede la aplicación de ninguna corrección matemática de este tipo, se estima que el 5% ($p < 0.05$) del total de las secuencias se ha podido seleccionar de forma casual.

Como material adicional se realizó una anotación ontológica de la base de datos de Gene Ontology, www.geneontology.org, rutas metabólicas KEGG, www.genome.jp/kegg/ usando la herramienta DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) del “National Institute of Allergy and Infectious Diseases” (NIAID) de Estados Unidos.

3.2.14. Validación de los resultados de microarrays mediante qPCR a tiempo real.

Los estudios de validación de resultados de las micromatrices de DNA, incluyendo la comprobación de la integridad de las muestras de RNA, las reacciones de retrotranscripción, diseño de oligonucleótidos y reacción de PCR a tiempo real, se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Las muestras de RNA se cuantificaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) y la pureza fue

determinada a través del cálculo de los cocientes 260/280 y 260/230. La integridad de las muestras se midió con el Bioanalizador Agilent 2100. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo a partir de 1 µg de RNA total de cada una de las muestras y usando el High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) con oligos al azar siguiendo las especificaciones del fabricante. Las condiciones de temperatura usadas incluyeron un primer paso de 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C y finalmente un último paso de 5 segundos a 85°C. Los controles sin RT se obtuvieron incluyendo un volumen equivalente de agua en lugar de la transcriptasa reversa. Los oligonucleótidos se diseñaron usando el Probe Finder Software (Roche Applied Science). En todos los casos, las secuencias se volcaron en “Blast” con objeto de evitar amplificaciones cruzadas (ver Tabla M1).

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron con la sonda SYBR Green (Applied Biosystems) por triplicado para cada par de muestra y gen, a partir de 5 ng de cDNA en un volumen final de 10 µl conteniendo 250 nM de cada oligonucleótido. Se comprobó la ausencia de contaminación de DNA genómico en los controles sin RT. El protocolo se realizó en un 7900HT (Applied Biosystems) y consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (10 min 95°C), 40 ciclos de amplificación (15 seg, 95°C; 1 min, 60°C de anillamiento y extensión; adquisición de fluorescencia) y un paso final de aumento gradual de la temperatura (0,1°C/seg) hasta 95°C (“melting curve”) para verificar la especificidad de la PCR. Los valores de Ct se volcaron al programa Genex (Multad Analyses AB, Sweeden). Con ayuda de esta herramienta de análisis se calcularon las medias de los triplicados de PCR, y se identificaron los candidatos idóneos según el algoritmo Normfinder para la normalización de los datos. Este algoritmo selecciona los genes más estables de modo que la corrección que introducen en cada caso es, por tanto, pequeña.

3.2.15. Análisis estadístico de los resultados.

Se aplicó el estadístico de contraste de la t de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los resultados. Los perfiles de expresión de los marcadores fueron analizados mediante conglomerados jerárquicos utilizando como herramienta el programa “Cluster Program” (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>). Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier aplicando el estadístico log rango con el software SPSS 11.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

Trabajos previos de nuestro grupo sugieren la existencia de dos vías alternativas por las que las células cancerígenas presentan una menor actividad mitocondrial: la disminución específica de la subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa (β -F1-ATPasa) en carcinomas de colon (Cuezva y cols., 2002), o la represión del programa de proliferación mitocondrial en hepatocarcinomas (de Heredia y cols., 2000; Cuezva y cols., 2002). Hemos definido mediante una aproximación proteómica sencilla la *huella bioenergética del cáncer* mostrando que está alterada en la mayoría de los tumores humanos (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007), y que sirve como herramienta para el diagnóstico y la prognosis de pacientes con distintos tipos de cáncer. Para evaluarla hemos estudiado la expresión de tres marcadores proteicos: la subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa (β -F1-ATPasa) por representar la proteína cuello de botella de la fosforilación oxidativa; una proteína estructural de la mitocondria, Hsp60; y una proteína del metabolismo glucolítico, GAPDH. El cociente entre β -F1 y Hsp60 define el “potencial bioenergético de la mitocondria” en cada tipo celular (Cuezva y cols., 2007). A su vez, la razón β -F1/GAPDH, que representa una simplificación del cociente β -F1/Hsp60/GAPDH definido por nuestro grupo como el índice Bioenergético Celular o índice BEC (Cuezva y cols., 2002), permite inferir la capacidad mitocondrial global de la célula al referir la actividad bioenergética de la mitocondria respecto del potencial glucolítico celular. Basándonos en estos resultados, y con el objetivo de esclarecer cómo afecta la alteración de la función mitocondrial a la progresión tumoral, decidimos modular y caracterizar el fenotipo bioenergético de dos líneas celulares tumorales derivadas de tejidos humanos; HCT116, como modelo de carcinoma colorrectal, y HepG2, como modelo de hepatocarcinoma.

4.1. Carcinoma colorrectal (CCR).

Los carcinomas de colon presentan una disminución específica en la expresión de β -F1-ATPasa respecto al componente estructural Hsp60 cuando se compara con el tejido sano (Cuezva y cols., 2002). Con el objetivo de estudiar la relevancia mitocondrial en carcinoma colorrectal caracterizamos el perfil bioenergético de la línea celular HCT116 y modulamos la expresión de la proteína β -F1-ATPasa. Para ello, tratamos las células durante 48h con oligomicina (OL), un inhibidor específico de la H^+ -ATP sintasa, y, de forma paralela, con 2-desoxiglucosa (2-DG), un inhibidor de la vía glucolítica. Antes de describir los resultados obtenidos en esta tesis conviene aclarar la nomenclatura utilizada para definir las células: denominamos, como consecuencia del fenotipo adquirido tras los tratamientos, G a las células tratadas con OL, y SM a las tratadas con 2-DG. En todo momento se llevó el control de las células sin tratamiento que definimos como M.

4.1.1. El fenotipo bioenergético de las líneas celulares HCT116.

El tratamiento de esta línea celular con OL produjo una disminución evidente en la expresión de la subunidad catalítica β -F1-ATPasa, (G vs. M en Fig. R1a). Por el contrario, el tratamiento con 2-DG resultó en células que exhibían un aumento en la expresión de la proteína (SM vs. M en Fig. R1a). Estos cambios observados en la expresión de β -F1-ATPasa en células G y SM se produjeron en ausencia de cambios relevantes en la expresión de la proteína estructural de la mitocondria Hsp60, así como del marcador glucolítico GAPDH (Fig. R1a). Se determinó en todos los casos la expresión del marcador α -tubulina que nos sirvió como control de carga de los experimentos. De esta manera, los índices proteómicos β -F1-ATPasa/GAPDH y β -F1-ATPasa/Hsp60 mostraron cambios paralelos resultando disminuidos de forma significativa en aquellas células que se trataron con OL (G vs. M en Fig. R1b), y fuertemente inducidos en las que se sometieron al tratamiento con 2-DG (SM vs. M en Fig. R1b). Del mismo modo, la expresión de la subunidad mitocondrial α -F1-ATPasa aumentó significativamente en células SM y disminuyó en células G en comparación con las células M (Fig. R1c). Estos resultados sugieren la existencia de un cambio en el fenotipo bioenergético de las células de colon producido, bien por alteraciones en el contenido mitocondrial celular, o bien por la diferenciación funcional del orgánulo. Puesto que la expresión de Hsp60 nos sirve como estimación de la masa mitocondrial celular, los cambios en la expresión de β -F1-ATPasa/Hsp60 sugieren un efecto sobre la diferenciación funcional de la mitocondria.

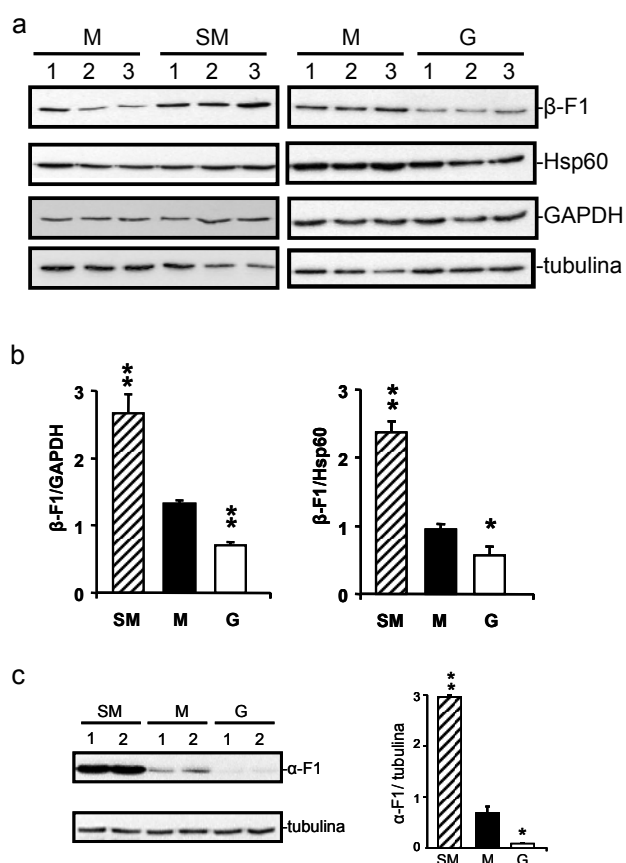


Figura R1. Regulación de la huella bioenergética en células HCT116 derivadas de carcinoma colorrectal.

(a) Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas β -F1-ATPasa, Hsp60, GAPDH y tubulina en tres preparaciones (carriles 1-3) de células tratadas con 2DG (SM), con OL (G) y sin tratamiento (M). Los histogramas en **(b)** representan la media \pm SEM de los índices bioenergéticos β -F1/GAPDH; SM, n=11; M, n=14; G, n= 11; y β -F1/Hsp60; SM, n=7; M, n=15; G, n= 8. **(c)** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas α -F1-ATPasa y tubulina en dos preparaciones (carriles 1-2) de células tratadas con 2DG (SM), con OL (G) y sin tratamiento (M). Los histogramas representan la media \pm SEM del cociente entre ambas proteínas. *, y **, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente.

Dado que los resultados descritos sugerían alteraciones en el mecanismo de diferenciación mitocondrial, quisimos corroborar que efectivamente, los cambios observados en la expresión de la proteína β -F1-ATPasa se podían relacionar con la aparición de modificaciones en el fenotipo ultraestructural de los orgánulos, o dicho de otra manera, que existía una alteración en la diferenciación funcional de las mitocondrias. El análisis detallado mediante técnicas de microscopía electrónica de secciones ultrafinas de cada uno de los tipos celulares puso de manifiesto que las células G contienen mitocondrias en su mayoría desprovistas de invaginaciones de la membrana mitocondrial interna o crestas mitocondriales (Fig. R2a), en comparación con los orgánulos presentes en células M o SM ambas con crestas más desarrolladas (Fig. R2b y c). La cuantificación relativa de la longitud de las crestas en proporción al ancho de la mitocondria nos sirvió para confirmar estas diferencias (Fig. R2d). Es importante resaltar asimismo, cómo las células M y SM presentan una mayor densidad electrónica de la matriz mitocondrial que las células G (Fig. R2d) lo que sugiere un mayor complemento de proteína mitocondrial en estos tipos celulares.

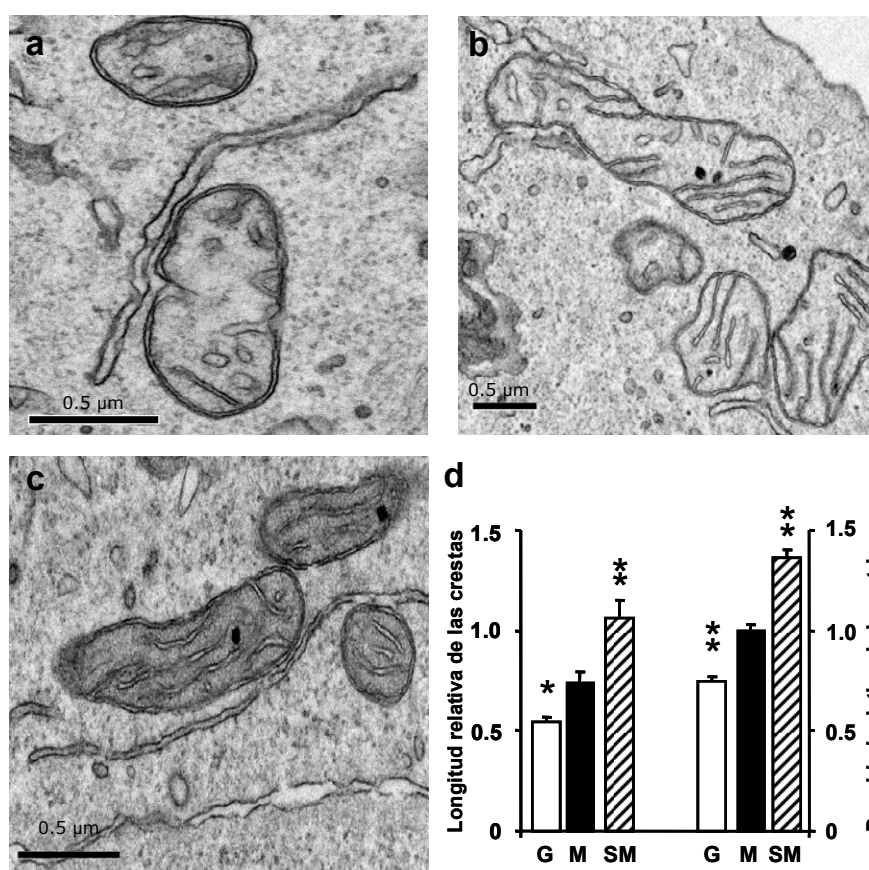


Figura R2. Ultraestructura mitocondrial en células SM, M y G. Secciones ultrafinas de células G (a), M (b) y SM (c) se procesaron como se describe en materiales y métodos (ver apartado 3.2.2.1) y se observaron al microscopio electrónico. El análisis de las imágenes reveló grandes diferencias ultraestructurales en las mitocondrias de células G frente a los orgánulos de células M o SM. Específicamente, las mitocondrias de células G carecen de invaginaciones de la membrana mitocondrial interna y tienen menor densidad mitocondrial. Los histogramas en (d) representan la media \pm SEM de la cuantificación de la longitud relativa de las crestas; G, n=83 determinaciones; M, n=61; SM, n=44; y la densidad relativa de la matriz; G, n=210; M, n=60, SM, n=60. * y **, p<0.05; p<0.001 al comparar frente a M, respectivamente.

Por otro lado, cuantificamos el número de orgánulos por célula mediante microscopía electrónica. Como se ilustra en la Figura R3 no observamos cambios significativos en el contenido mitocondrial dependiendo del tipo celular estudiado. Estos resultados confirman que los tratamientos afectan la diferenciación funcional del orgánulo.

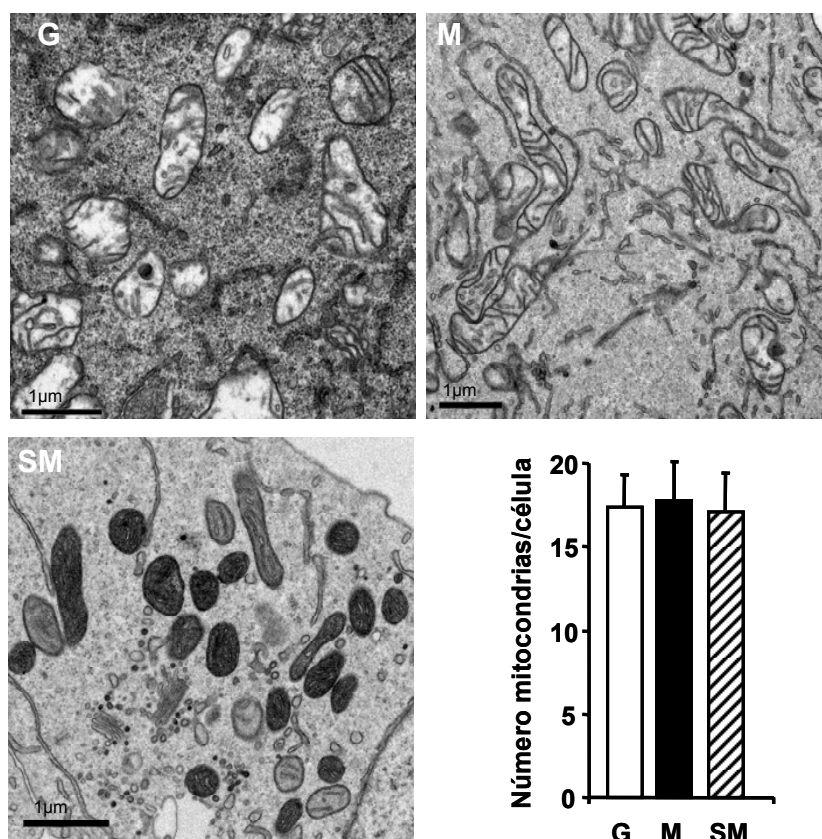


Figura R3. Los cambios en el fenotipo bioenergético no afectan al número de orgánulos por célula. Secciones ultrafinas de células G, M y SM se procesaron por técnicas de microscopía electrónica tal y como se describe en materiales y métodos (ver sección 3.2.2.1). La observación de diversos campos seleccionados al azar revela la ausencia de diferencias en el contenido mitocondrial entre los 3 fenotipos bioenergéticos. El histograma representa la cuantificación del número de mitocondrias por célula en quince células por cada condición elegidas aleatoriamente.

Con el fin de determinar si los cambios observados a nivel molecular y estructural se reflejaban en la actividad metabólica de las células HCT116, analizamos el flujo glucolítico de las mismas mediante la determinación de la producción de lactato en condiciones de aerobiosis. El flujo glucolítico correlaciona inversamente con la capacidad mitocondrial de la célula estimada por el índice β -F1-ATPasa/GAPDH (Fig. R4a), de forma que aquellas células con mayor glucolisis aerobia (G) tienen menor índice bioenergético, mientras que las células que presentan un menor flujo glucolítico son aquellas cuyo índice bioenergético es más elevado (SM) (Fig. R4a). Estos parámetros mostraron una correlación inversa significativa entre ellos ($R=-0,676$; $p<0,01$; $n=28$). Del mismo modo, se analizó el efecto que los tratamientos ejercían sobre la respiración mitocondrial, y encontramos que si bien no se aprecian cambios ni en respiración basal ni en respiración máxima (en respuesta a FCCP) entre los tres tipos celulares (datos no mostrados), se produce una alteración muy evidente en la respiración sensible a oligomicina (RSO) (Fig. R4b). De este modo, y apoyando el papel fundamental que desempeña β -F1-ATPasa como cuello de botella de la fosforilación

oxidativa, se observa una correlación directa entre el índice β -F1-ATPasa/GAPDH y la tasa de respiración sensible a oligomicina ($R=0,534$; $p<0,05$; $n=21$) (Fig. R4c). De hecho, respiración sensible a OL y flujo glucolítico presentan un relación lineal inversa altamente significativa ($R=-0,50$; $p<0,05$; $n=22$) (Fig. R4d) indicando que el consumo de glucosa de una célula depende de la energía aportada por fosforilación oxidativa.

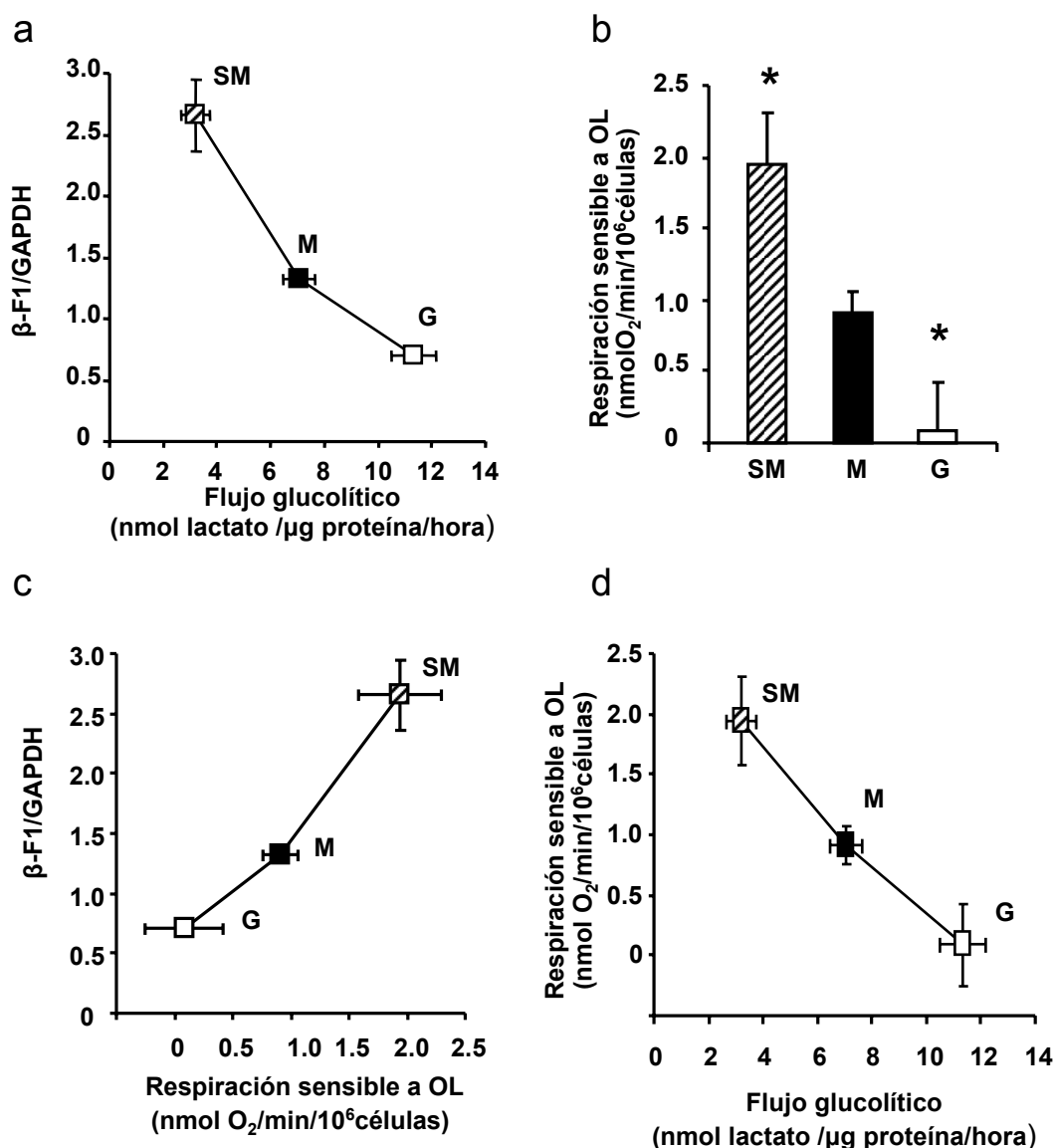


Figura R4. Caracterización del fenotipo metabólico en células HCT116 derivadas de carcinoma colorrectal. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se cultivaron en medio McCoy's 5A y se procesaron para la determinación de la tasa de glucólisis aerobia y el consumo de oxígeno celular. **(a)** El flujo glucolítico muestra una asociación inversa muy significativa con el índice bioenergético estimado por el cociente β -F1/GAPDH (SM, $n=6$; M, $n=15$; G, $n=8$ determinaciones independientes), de modo que una mayor tasa de glucólisis aerobia (células G) se corresponde con una menor función mitocondrial y viceversa. **(b)** La respiración sensible a oligomicina se determinó tras la adición de OL (6 μ M). Las barras representan la media \pm SEM de 6, 15 y 8 determinaciones independientes en células SM, M y G respectivamente. *, $p<0,05$ al comparar frente a M. Los gráficos en **(c)** y **(d)** muestran la relación directa que existe entre el fenotipo bioenergético y la respiración sensible a oligomicina y la asociación inversa entre la actividad de la fosforilación oxidativa (estimada por la respiración sensible a OL) y la tasa de glucólisis aerobia en los tres fenotipos celulares, respectivamente.

En conjunto, estos resultados indican que el nivel de expresión de la proteína mitocondrial β -F1-ATPasa tiene un profundo impacto a nivel estructural y funcional de la mitocondria, siendo además determinante a la hora de definir el metabolismo celular de la glucosa. Por esta razón, las células tratadas con OL, que mostraron baja expresión de β -F1-ATPasa (Fig. R1), mitocondrias con menos crestas (Fig. R2), elevado flujo glucolítico (Fig. R4) y actividad OXPHOS comprometida (Fig. R4), se definieron como G o Glucolíticas. Por otro lado, las células tratadas con 2-DG, que presentaron alta expresión de β -F1-ATPasa (Fig. R1), mitocondrias con crestas bien desarrolladas (Fig. R2), bajas tasas de glucolisis (Fig. R4) y mayor actividad de la fosforilación oxidativa (Fig. R4) se definieron como SM o Super Mitocondriales. Las células control sin tratamiento, con un fenotipo bioenergético intermedio, se denominaron M o Mitocondriales.

4.1.2. El fenotipo glucolítico favorece el crecimiento tumoral *in vivo*.

Con el objetivo de determinar si los cambios observados afectaban al ritmo de crecimiento de las células, se analizó la proliferación celular de los distintos fenotipos bioenergéticos (M, G, y SM), y, como se muestra en la Figura R5a, la tasa de crecimiento de las células así como el contenido total de proteínas en las muestras no reveló ritmos de proliferación diferentes para las células en cultivo. El estudio mediante citometría de flujo del porcentaje de células presente en cada una de las fases del ciclo celular reveló una distribución muy similar de células en las distintas fases del ciclo entre los fenotipos M, G y SM (Fig. R5b). Estos resultados sugieren que la bioenergética de las células no afecta a la tasa de proliferación celular *in vitro*.

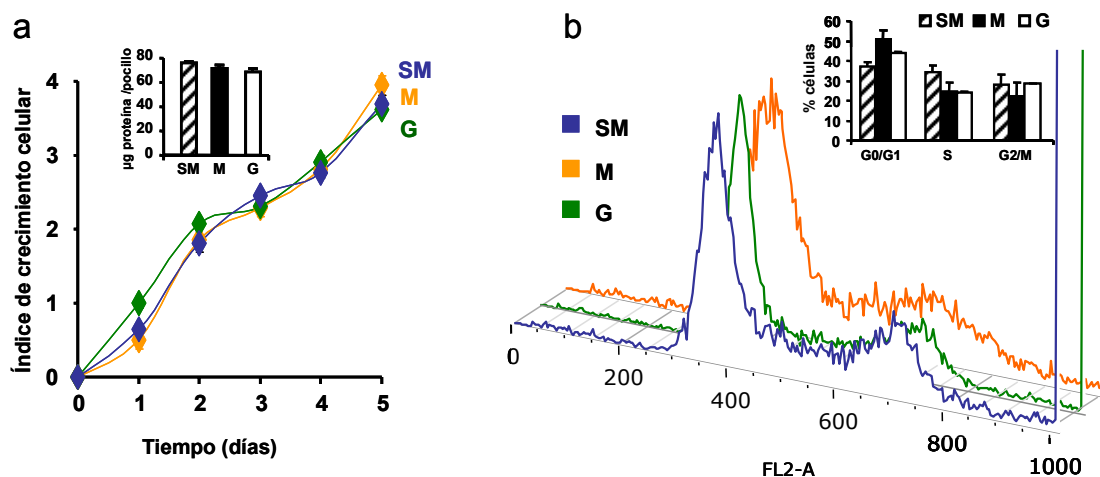


Figura R5. El fenotipo bioenergético no condiciona el ritmo de proliferación celular *in vitro*. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se mantuvieron en cultivo durante varios días y (a) se determinó el ritmo de crecimiento mediante la estimación del parámetro índice de crecimiento celular (ver sección 3.2.4 de materiales y métodos) y el contenido total de proteína (histogramas en la parte superior). Los resultados son la media \pm SEM de 4 determinaciones independientes. (b) Perfil representativo del ciclo celular en células SM, M, y G, determinado por citometría de flujo. El histograma en la parte superior representa la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

A continuación, estudiamos la influencia del fenotipo bioenergético sobre el ritmo de crecimiento tumoral en un sistema *in vivo*. Para ello, se inocularon 10^7 células de cada condición metabólica en el flanco trasero derecho de ratones inmunosuprimidos “desnudos” y se verificó la aparición de tumores en los animales. Por motivos éticos, el seguimiento de los animales se realizó durante un periodo no superior a 50 días, momento en el cual el volumen tumoral era aproximadamente de 3.000 mm^3 ($\sim 2\text{g}$), suponiendo casi un 10% del peso del animal. Debemos destacar que todos los ratones acabaron desarrollando tumores, si bien los animales inoculados con células G desarrollaron los tumores en un período de tiempo más corto (Fig. R6a). Los animales inoculados con células M y SM no mostraron diferencias en el tiempo de crecimiento del tumor (Fig. R6a), por este motivo, decidimos agruparlos y compararlos con los G en un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

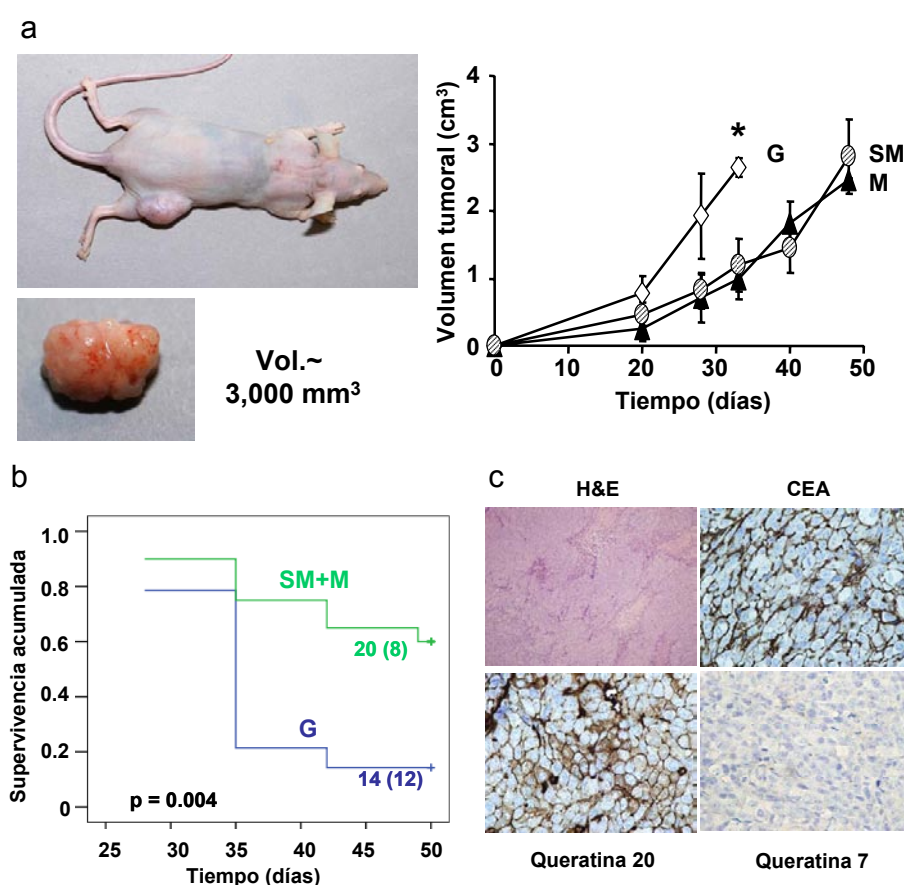


Figura R6. El fenotipo glucolítico promueve el crecimiento tumoral *in vivo*. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se inocularon en el flanco trasero derecho de ratones desnudos y los tumores se extrajeron al alcanzar un volumen de 3cm^3 . **(a)** Las células más glucolíticas (G) aceleran el crecimiento del tamaño tumoral (cm^3). *, $p < 0,05$ al comparar frente a M. **(b)** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales (SM, 6; M, 14; G, 14). Los ratones inoculados con células SM y M se analizaron conjuntamente debido a que no presentan diferencias en sus ritmos de crecimiento tumoral ($n=20$). Los ratones inoculados con células G tienen una menor supervivencia. $p = 0,004$ es el p-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba del Log-Rango. **(c)** Se muestran fotografías representativas de la tinción por hematoxilina-eosina ($\times 100$) y del análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas CEA (*carcinoembryonic antigen*), usada frecuentemente como marcador en cáncer de tracto gastrointestinal, y de las citoqueratinas 7 (tinción negativa) y 20 (tinción positiva) ($\times 400$), cuyo patrón de expresión sirve para establecer una correlación clínica-patológica en los tumores, siendo marcadores de célula desdiferenciada y diferenciada, respectivamente.

El resultado muestra que los animales inoculados con las células con mayor potencial glucolítico (G) presentan peor supervivencia ($p=0.004$) (Fig. R6b) indicando, que *in vivo* una actividad mitocondrial comprometida y una mayor capacidad glucolítica son ventajas fenotípicas para la progresión del cáncer de colon. La tinción por hematoxilina-eosina así como la expresión mediante técnicas de inmunohistoquímica de las proteínas CEA (*carcinoembryonic antigen*), usada frecuentemente como marcador en cáncer de tracto gastrointestinal, y de las citoqueratinas 7 y 20, cuyo patrón de expresión sirve para establecer una correlación clínica-patológica en los tumores, nos sirvió para verificar que los tumores analizados derivaban de cáncer colorrectal (Fig. R6c).

4.1.3. La bioenergética celular condiciona la respuesta a muerte.

Se ha descrito que la fosforilación oxidativa y la actividad de la H^+ -ATPasa son necesarias para la correcta ejecución de apoptosis (Matsuyama y cols., 1998; Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006). En este sentido, nos planteamos si las células G tendrían una menor tasa de muerte celular. Para responder a esta cuestión, se analizó la muerte celular por citometría de flujo en respuesta a 5-FU (10 μ M) a las 48h en células SM, M y G (Fig. R7a). Observamos la existencia de una correlación directa ($R=0,766$; $P<0,01$; $n= 24$) entre la actividad de la fosforilación oxidativa y la respuesta a muerte celular, así, aquellas células con mayor nivel de expresión de la proteína β -F1-ATPasa (SM) presentaban un fenotipo más susceptible a muerte, y por el contrario células con menores niveles de expresión de esta proteína (células G) eran más resistentes (Fig. R7a).

Hemos descrito que el mecanismo de participación de la H^+ -ATP sintasa en muerte celular está mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno (Santamaria y cols., 2006). De acuerdo con estos resultados, comprobamos que la producción de ROS en respuesta a 5-FU era función de la expresión de β -F1-ATPasa y en definitiva del metabolismo energético de las células (Fig. R7b). La inhibición de la actividad de la H^+ -ATP sintasa previno muy significativamente la producción de ROS en células SM (Fig. R7c) y atenuó la muerte celular inducida por 5-FU (Fig. R7c). Resultados similares se obtuvieron con células M (datos no mostrados). Uno de los efectos producidos por las especies reactivas de oxígeno en las células es la modificación covalente de proteínas. En este sentido, el tratamiento de las células SM con 5-FU promovió un aumento muy significativo de la carbonilación de proteínas celulares que el antioxidante NAC no fue capaz de bloquear (Fig. R7d).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la relevancia del fenotipo bioenergético celular en la respuesta a muerte, y confirman la implicación de la H^+ -ATPasa en la generación de una señal temprana de ROS para la ejecución eficiente de la muerte celular en las células HCT116. Por otro lado, permiten sugerir que parte del mecanismo subyacente a la habilidad de las células G para generar tumores podría deberse a su fenotipo de resistencia a muerte celular.

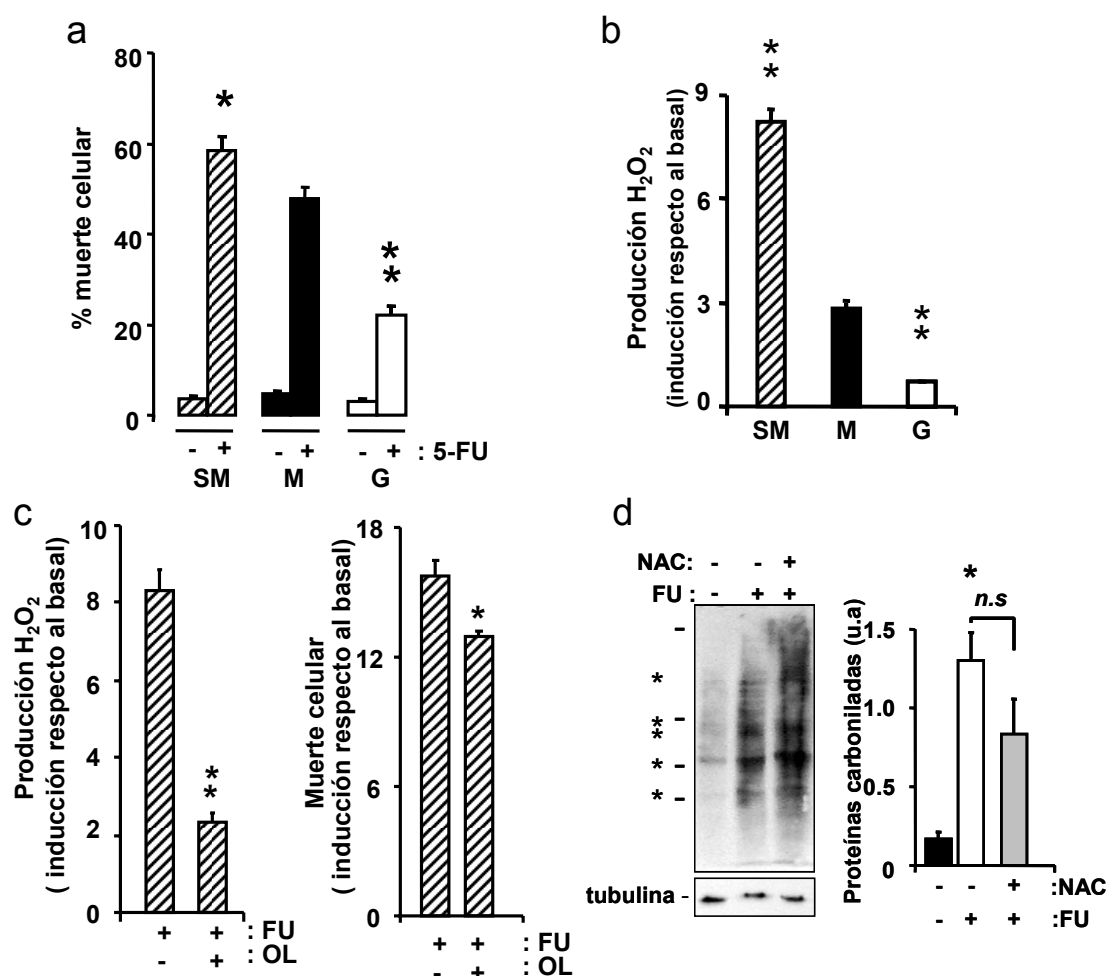


Figura R7. El fenotipo bioenergético correlaciona con la respuesta celular a muerte tras el tratamiento con 5-FU. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se expusieron a 10 μ M 5-FU como se indica. **(a)** Se analizaron a las 48h por citometría de flujo para la determinación de la proporción de células con el DNA fragmentado (picos hipodiploides). Los histogramas representan la media \pm SEM de 9, 13 y 7 determinaciones independientes para SM, M y G, respectivamente. **(b)** Las células se analizaron por citometría de flujo para la determinación de la producción de H_2O_2 . Los resultados muestran la media \pm SEM de 6, 7 y 6 determinaciones independientes para SM, M y G, respectivamente. * y **, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ al comparar frente a M. **(c)** Las células SM se trataron en ausencia o presencia de OL (6 μ M) durante 1 hora y a continuación se añadió o no 5-FU para determinar por citometría de flujo la producción de H_2O_2 y el porcentaje de células con fragmentación de DNA. Los resultados representan la media \pm SEM de 6, 6 y 4 determinaciones independientes para células SM sin tratar, tratadas con 5-FU y 5-FU/OL, respectivamente. * y **, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ al comparar frente a SM tratadas con 5-FU. **(d)** Células tratadas con 2DG (SM) se trataron en presencia o ausencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) (200 μ M) y a continuación se añadió o no 5-FU. Extractos de proteína celular (20 μ g) se derivatizaron en presencia de DPNH y se procesaron para la identificación de grupos carbonilos de proteínas. La carga de las muestras se verificó mediante la expresión de la proteína α -tubulina por *western blot*. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la imagen (97, 66, 45 y 30 KDa). Los asteriscos indican las cinco proteínas que se usaron en la cuantificación de la carbonilación proteica en los distintos tratamientos. Los histogramas son la media \pm SEM de cinco determinaciones. **, $p < 0,001$ al comparar frente a células sin tratar; n.s, no-significativo al comparar con células tratadas con NAC.

4.1.4. Diferencias en el transcriptoma de células M y G.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos que gobiernan la progresión del cáncer colorrectal nos propusimos realizar un análisis diferencial del transcriptoma de

células M y G que nos permitiera identificar los genes responsables y/o alterados durante el proceso de carcinogénesis. No se incluyó a las células SM en este estudio porque desde el punto de vista del desarrollo del tumor no presentaban diferencia con las células M. Usamos micromatrices de oligonucleótidos mediante la plataforma “Human Genome U133 Plus 2.0” de Affymetrix que interroga a 54,613 secuencias. Se realizaron tres micromatrices por cada condición experimental (M y G) procedentes de tres réplicas biológicas independientes. El análisis comparado de las seis muestras bajo las dos condiciones experimentales proporcionó una lista de sondas que presentaban diferencias de expresión entre las células M y G (Partek I suministrado en soporte digital).

Comparación	Test de corrección múltiple	Nº de secuencias significativas	Falsos positivos
G vs. M	no	4519	487.75
G vs. M	FDR	2916	145.08
G vs. M	Bonferroni	20	0.05

Tabla R1. Resultado del análisis estadístico. La tabla resume los resultados obtenidos en la comparación no emparejada entre células G y M (4519 secuencias). Se indica la aplicación o no de los test de corrección múltiple FDR (test de Benjamini y Hochberg) y Bonferroni, el número de secuencias significativas en cada caso, y el número de secuencias que aparecen significativas por azar (falsos positivos).

La Tabla R1 muestra un total de 4,519 secuencias que presentan variaciones significativas en la comparación no emparejada entre M y G. Los códigos que encontramos con una expresión diferencial entre las células M y G se agruparon según los criterios del consorcio Gene Ontology (GO) para los Procesos Biológicos y Funciones Moleculares. Obtuvimos así una lista de 3,430 genes, de ellos 368 estaban adscritos a Rutas Kegg (Tabla R2), diagramas que representan el conocimiento actual de redes e interacciones moleculares, 2,387 a diferentes Procesos Biológicos (Tabla R2), 2,581 a Funciones Moleculares y 2,558 a Componentes Celulares, y cuyo análisis de agrupamiento jerárquico ilustra los diferentes perfiles de expresión génica entre células M y G (Fig. R8).

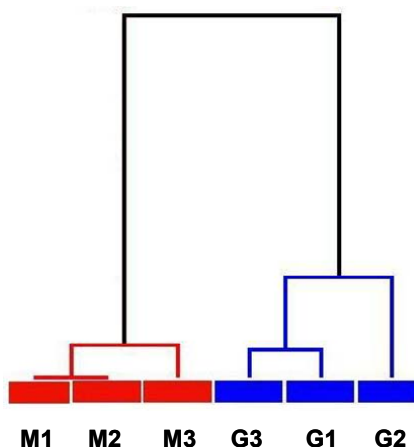


Figura R8. Análisis de expresión génica de células HCT116.

Réplicas biológicas de células tratadas con OL (G) y no tratadas (M) se procesaron por triplicado (M1-M3; G1-G3) para el análisis de su transcriptoma. El agrupamiento jerárquico de células M (en rojo) y G (en azul) realizado a partir de la lista de trabajo (9755 secuencias) representa la separación de las muestras en función de la condición experimental a la que pertenecen.

Existen cambios muy significativos en la expresión de genes implicados en rutas del metabolismo intermediario, metabolismo energético, biosíntesis de nucleótidos y esteroides, síntesis y degradación de proteínas, regulación del ciclo celular, y rutas involucradas en cáncer (Tabla R2). Dentro de los procesos biológicos más relevantes se obtuvieron cambios en genes importantes para el procesamiento de RNA, procesos metabólicos, regulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación celular, biogénesis mitocondrial, adhesión celular y desarrollo vascular (Tabla R2). La Tabla R3 resume los genes que se encontraron diferencialmente expresados tomando como punto de corte un valor de FDR < 0.005 y Bonferroni $p < 0.15$ como ejemplo de alguno de estos procesos.

Rutas Kegg (368 genes)			
	% de genes identificados	p-valor	Benjamini (p-valor)
Ciclo celular	50	2,8E-11	5,7E-9
Biosíntesis de aminoacil-tRNAs	61	5,3E-7	5,4E-5
Metabolismo de pirimidinas	41	3,0E-5	2,0E-3
Proteasoma	64	9,2E-5	4,6E-3
Biosíntesis de esteroides	58	3,0E-4	1,2E-2
Cáncer de páncreas	39	3,8E-4	1,3E-2
Metabolismo de purinas	33	1,1E-3	3,0E-2
Metabolismo de alanina y aspartato	48	1,2E-3	2,9E-2
Cáncer de próstata	35	1,9E-3	4,1E-2
Metabolismo del piruvato	43	2,7E-3	5,3E-2
Ruta de señalización de p53	37	3,6E-3	6,4E-2
Ciclo de Krebs	52	4,2E-3	6,8E-2
Metabolismo del glutamato	47	4,2E-3	6,8E-2
Procesos Biológicos (2387 genes)			
	% de genes identificados	p-valor	Benjamini (p-valor)
Procesamiento de RNA	40	1,8E-32	9,3E-29
Procesos metabólicos	21	8,8E-28	1,2E-24
Regulación del ciclo celular	31	4,7E-18	1,7E-15
Apoptosis	27	6,5 E-14	1,7E-11
Diferenciación celular	21	1,3E-8	1,4E-6
Biogénesis mitocondrial	38	3,1E-6	2,1E-4
Adhesión célula-célula	24	2,7E-3	7,2E-2
Desarrollo vascular	25	2,7E-3	7,3E-2
Procesos del metabolismo intermediario	48	2,8E-3	7,3E-2
Procesos del metabolismo de glucosa	30	3,2E-3	8,1E-2

Tabla R2. Resumen de las rutas Kegg y Procesos Biológicos diferencialmente expresados entre células M y G. La lista de los códigos con una expresión diferencial entre las células M y G se agruparon según los criterios del consorcio Gene Ontology (GO) para los Procesos Biológicos y Funciones Moleculares. Se obtuvieron 3430 genes, de ellos 368 están adscritos a Rutas Kegg, diagramas que representan el conocimiento actual de redes e interacciones moleculares, y 2387 a diferentes Procesos Biológicos. La tabla resume el porcentaje de genes identificado en cada una de las rutas o procesos, y el p-valor cuando se aplica el test estadístico utilizando el software Partek y el test de corrección múltiple Benjamini y Hochberg.

En las células G se encontraron sobreexpresados los genes DDIT3 (*DNA-Damage-Inducible-Transcript 3*), un inhibidor del factor de transcripción c/EBP, y GADD45A (*Growth Arrest- and DNA Damage-inducible gene*), una proteína nuclear implicada en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. El oncogén FOS, uno de los principales componentes del complejo de transcripción AP-1 (*Activator Protein-1*), resultó altamente reprimido en las células G (Tabla R3). Los genes Nt5e (*ecto-5-nucleotidase*), una enzima crítica para la generación de adenosina y muy relevante en proliferación celular; UPP1 (*uridine phosphorylase 1*), necesaria para la biosíntesis de nucleósidos, PHGDH (*3-phosphoglycerate dehydrogenase*), que cataliza un paso limitante en la biosíntesis de serina, y PGLS (*6-phosphogluconolactonase*) y TALDO1 (*Transaldolase 1*), que codifican enzimas clave de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) resultaron muy inducidos en las células G (Tabla R3). Es importante destacar que algunos genes implicados en desarrollo vascular y angiogénesis también resultaron sobreexpresados en las células G (Tabla R3).

Nombre de la proteína	Símbolo gen	Valor de cambio	FDR p-valor	Bonferroni p-valor	Actividad/ Función
Sobreexpresadas en células G					
Lipocalin 2	LCN2	7,47	5,93E-04	0,00098	Transporte de hierro/ Endocitosis
Ribosomal protein L37	RPL37	1,79	5,93E-04	0,00119	Síntesis de proteínas
Uridine phosphorylase 1	UPP1	8,62	1,32E-03	0,00644	Metabolismo de nucleótidos
Tribbles homolog 3	TRIB3	4,84	1,32E-03	0,00761	Ciclo celular
Chromosome 6 open reading frame 48	C6orf48	2,26	1,32E-03	0,01114	Transporte de hierro
Kallikrein-related peptidase 6	KLK6	1,70	1,32E-03	0,01141	Degradación de proteínas
Transaldolase 1	TALDO1	1,67	1,32E-03	0,01332	Ruta pentosas fosfato
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	5,34	1,32E-03	0,01464	Protooncogén
Serine/threonine kinase 24	STK24	1,42	1,32E-03	0,01559	Señalización
Chloride intracellular channel 4	CLIC4	1,77	1,43E-03	0,01929	Homeostasis celular
Integrin, beta 1	ITGB1	1,49	1,43E-03	0,02003	Desarrollo vascular
6-phosphogluconolactonase	PGLS	1,69	1,46E-03	0,02189	Ruta pentosas fosfato
Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	2,54	1,79E-03	0,03044	Síntesis de aminoácidos (Ser)
Cystatin A (stefin A)	CSTA	4,34	1,79E-03	0,03341	Degradación de proteínas
Chromosome 19 open reading frame 33	C19orf33	2,72	2,14E-03	0,04271	Tumorigénesis
EH domain binding protein 1	EHBP1	1,53	2,36E-03	0,05102	Endocitosis
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	5,27	2,36E-03	0,05420	Degradación de matriz extracelular
Asparagine synthetase	ASNS	4,44	2,58E-03	0,06789	Ciclo celular-progresión G1
SH3-domain kinase binding protein 1	SH3BP1	2,44	2,58E-03	0,07473	Endocitosis/señalización EGFR
Carboxypeptidase A4	CPA4	1,62	2,58E-03	0,07482	Proliferación/diferenciación celular
Calbindin 2, 29kDa (calretinin)	CALB2	3,54	3,04E-03	0,12476	Regulación intracelular de Ca ²⁺
Neuropilin 1	NRP1	10,11	3,06E-03	0,13754	Desarrollo vascular
AXL receptor tyrosine kinase	AXL	3,51	3,22E-03	0,15295	Oncogén
Sestrin 2	SESN2	4,08	3,22E-03	0,15450	Respuesta a estrés oxidativo
Reprimidas en células G					
FK506 binding protein 5	FKBP5	-2,19	1,32E-03	0,00729	Biogénesis de proteínas
Transcription factor 7-like 1	TCF7L1	-1,67	1,32E-03	0,01584	Factor de transcripción/ Ruta de Wnt
Sperm specific antigen 2	SSFA2	-2,57	1,61E-03	0,02577	Receptor de integrinas
v-fos FBJ viral oncogene	FOS	-7,84	2,36E-03	0,05192	Biogénesis mitocondrial
Cofilin 2 (muscle)	CFL2	-2,09	2,58E-03	0,06760	Dinámica de filamentos de actina
Mitochondrial ATP synthase, F0-subunit F2	ATP5J2	-1,70	2,58E-03	0,07060	OXPHOS
Mitochondrial ATP synthase, F0-subunit C3	ATP5G3	-1,64	2,58E-03	0,07141	OXPHOS
KIT ligand	KITLG	-3,28	2,66E-03	0,07975	Inhibidor de diferenciación
Dehydrogenase/reductase member 2	DHRS2	-2,00	2,68E-03	0,08312	Ciclo celular
Crystallin, mu	CRYM	-2,01	2,68E-03	0,09104	Proteína de unión a T3
Synaptotagmin-like 2	SYTL2	-4,73	2,69E-03	0,09683	Sensor de Ca ²⁺ / Tráfico de proteínas

Tabla R3. Secuencias diferencialmente expresadas entre células M y G. La tabla resume la lista de las secuencias que se encuentran más significativamente sobreexpresadas o reprimidas en células G cuando se comparan frente a células M. El criterio para la inclusión de los genes en la lista atiende al grado de significatividad (p-valor) tras aplicar los test de corrección múltiple Bonferroni y FDR. Se indica el nombre de la proteína, el símbolo del gen que la codifica, el valor de cambio, el p-valor cuando se aplica el test de corrección múltiple de FDR (Benjamini y Hochberg) y Bonferroni así como la función más relevante en la que participa cada gen en el contexto celular.

Entre ellos, VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*), estrechamente asociado con el proceso de angiogénesis; NRP1 (*neuropilin-1*), un receptor de VEGF que juega un papel muy importante en angiogénesis, migración celular e invasión; LCN2 (*lipocalin-2*), que regula genes del metabolismo del hierro y participa en procesos de invasión celular; ITGB1 (*integrin β*), una proteína que regula la adhesión a la matriz extracelular y de gran relevancia en procesos de migración celular e invasión, y PLAU (*urokinase-type plasminogen activator*), que participa en procesos de degradación de la matriz extracelular. Por otro lado, encontramos reprimida la expresión de genes que participan activamente en las rutas de Wnt o del Ca^{2+} , regulación de la dinámica del citoesqueleto, fosforilación oxidativa y biogénesis de la mitocondria (Tabla R3).

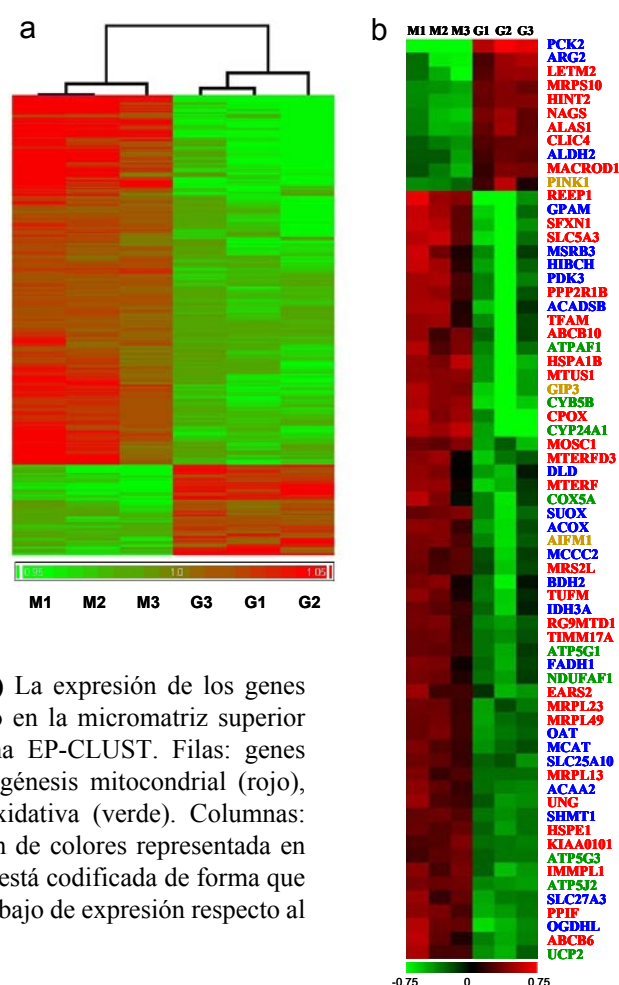
4.1.5. Las células G reprimen la expresión de la mayoría de los genes mitocondriales.

Las Tablas R2 y R3 enfatizan también que las células G tienen reprimida la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial. Así, de los 369 genes significativos en el análisis relacionados con procesos mitocondriales, el 80% (297 genes) se encontraron reprimidos en las células G (Fig. R9a). Con el fin de ilustrar este punto, seleccionamos aquellos genes cuyo valor de cambio era igual o superior a 1.5 confirmándose la tendencia de represión masiva de genes mitocondriales en estas células (Fig. R9b).

Figura R9. El análisis de la expresión génica revela la represión de la biogénesis mitocondrial en células G.

Células tratadas con OL (G) y no tratadas (M) se usaron para el análisis de expresión génica diferencial mediante la plataforma “Human Genome U133 Plus 2.0” de Affymetrix. (a) El clúster jerárquico ilustra la agrupación de células M (n=3) y G (n=3) en función de la expresión de los 369 genes relacionados con procesos mitocondriales significativos en el análisis. El análisis genera el agrupamiento de las muestras en función de la condición experimental de procedencia que se representa en la parte superior en forma de dendrograma.

(b) La expresión de los genes mitocondriales con un valor de cambio en la micromatriz superior a 1.5 se analizó mediante el programa EP-CLUST. Filas: genes implicados en metabolismo (azul), biogénesis mitocondrial (rojo), apoptosis (amarillo) y fosforilación oxidativa (verde). Columnas: muestras M1-M3; G1-G3. La gradación de colores representada en la parte inferior de ambas agrupaciones está codificada de forma que el rojo y el verde indican un valor alto y bajo de expresión respecto al de referencia respectivamente.



Hay que mencionar que los genes que codifican las enzimas EM (*malic enzyme*), PC (*pyruvate carboxylase*) y PCK2 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 2*), que participan en las reacciones de reposición de intermediarios del Ciclo de Krebs (rutas anapleróticas), resultaron inducidos en las células G (Partek I suministrado en soporte digital y Fig. R9). La reposición de estos intermediarios favorece la síntesis de aminoácidos por transaminación (aspartato y glutamato fundamentalmente). En este sentido, encontramos sobreexpresados los genes GOT1 (*aspartate aminotransferase 1*), y GLUD1 (*glutamate dehydrogenase 1*), que codifican dos enzimas mitocondriales responsables de la síntesis del glutamato (Partek I suministrado en soporte digital y Fig. R9). Asimismo, encontramos inducidos dos genes que codifican enzimas del ciclo de la urea, como son ARG2 (*arginase-2*) y NAGS (*N-acetyl-glutamate synthetase*) (Fig. R9b), el gen ALAS1 (δ -aminolevulinate synthase-1), que cataliza el paso limitante de la síntesis del grupo hemo (Fig. R9b), CLIC4 (*chloride intracellular channel 4*), que regula la homeostasis celular (Fig. R9b), y PINK (*PTEN-induced kinase*), una serina-treonina quinasa mitocondrial relacionada con la actividad del proteasoma que confiere protección celular frente a estrés inducido por daño mitocondrial (Fig. R9b).

Las células G mostraron una disminución muy significativa de la expresión de genes mitocondriales relacionados con la maquinaria transcripcional y traduccional, por ejemplo, mTERF, el factor de terminación de transcripción mitocondrial, TFB1M, TFB2M y TFAM, los factores de transcripción mitocondriales, y TUFM, el factor de elongación de la traducción mitocondrial Tu (Fig. R9b). El mismo patrón de represión se observó en la expresión de genes de la cadena de transporte de electrones: NDUFAF1, factor de ensamblaje 1 del complejo NADH-ubiquinona oxidoreductasa 1, y COX7b, que codifica la subunidad VIIb del complejo citocromo c oxidasa (Fig. R9b). De especial interés es la represión de la expresión de las subunidades del complejo V. Entre ellas, cabe destacar ATP5G1, ATP5G3 y ATP5J2, que codifican las subunidades c, isoformas 1 y 3, y la subunidad f, isoforma 2 del complejo F0 de la H⁺-ATP sintasa respectivamente, y ATPAF1, el factor de ensamblaje del complejo F1 de la H⁺-ATP sintasa (Fig. R9b), lo que apoya a nivel transcriptómico el fenotipo metabólico observado en las células G (Fig. R4). Asimismo, se observó la disminución en la expresión de genes del metabolismo mitocondrial y apoptosis en las células G, entre ellos, AIFM1, el factor inductor de apoptosis 1; BNIP3, una proteína de interacción con Bcl-2; cytb5, un componente de la NADH-cytb5 reductasa de la membrana externa mitocondrial; IDH3A, la subunidad A de la isocitrato deshidrogenasa del ciclo de Krebs; y PDHB, la subunidad β de la piruvato deshidrogenasa E1 (Fig. R9).

Por otro lado, los genes de mitofusina 1 (MFN1), y mitofusina 2 (MFN2), implicados en el proceso de fusión mitocondrial, así como el gen de prohibitina 2 (PHB2), responsable de la aparición de fenotipos aberrantes en las crestas mitocondriales (Merkwirth y Langer, 2009), están reprimidos en las células G, lo que apoya la existencia de una desregulación de la morfogénesis del orgánulo subyacente al fenotipo G. Del mismo modo, existen

alteraciones en la expresión de genes que codifican para las translocasas mitocondriales, por ejemplo, las subunidades 22 y 40 de la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM) así como diversas subunidades (13, 17, 22, y 23) de la translocasa de membrana interna (TIM) están reprimidas en las células G. Todo ello, apoya un menor tráfico de proteínas al interior de la mitocondria en las células con fenotipo G, y de forma general una represión de la biogénesis mitocondrial.

Algunos de los genes relacionados con el fenotipo tumoral y función mitocondrial obtenidos en el estudio de micromatrices de DNA (Fig. R9 y Tabla R3), se validaron por análisis de qPCR a tiempo real (Fig. R10). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la adquisición del fenotipo G, más competente para la progresión tumoral, pasa por la represión de la función mitocondrial con la consiguiente adquisición del fenotipo más glucolítico y de resistencia a muerte.

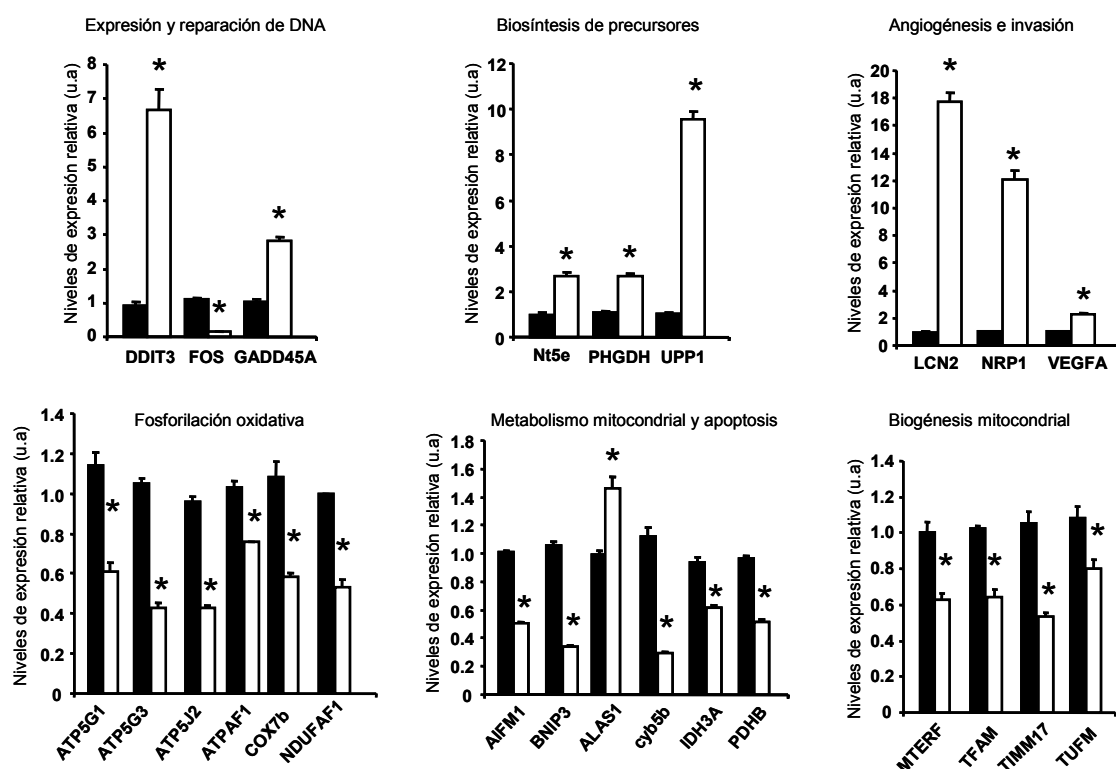


Figura R10. El análisis por qPCR a tiempo real de algunos genes relevantes en cáncer y función mitocondrial confirma los resultados de expresión génica obtenidos en la micromatriz de DNA. Células tratadas con OL (G) y no tratadas (M) se emplearon para el análisis por RT-PCR. Los niveles de expresión relativa se normalizaron usando el criterio del algoritmo Normfinder respecto a la expresión de los genes actina, ND6 y PGLS determinada también por qPCR. Los histogramas representan la media±SEM de 3 réplicas biológicas para M (barras negras) y G (barras blancas). *, $p < 0,001$ al comparar frente a M.

4.1.6. El desarrollo tumoral requiere la selección de células con represión de la biogénesis mitocondrial (fenotipo G).

El análisis de la *huella bioenergética* de los tumores resultantes de implantar células G, M y SM demostró la ausencia de diferencias en el nivel de expresión de las proteínas

mitocondriales β -F1-ATPasa, Hsp60 y de la enzima glucolítica GAPDH entre los distintos tipos de tumores analizados (Fig. R11a), y por tanto, los índices bioenergéticos, β -F1/Hsp60 y β -F1/GAPDH resultaron idénticos entre todos ellos (Fig. R11b). Hay que resaltar que el fenotipo mitocondrial de todos los tumores analizados resultó igual al de las células G y significativamente más bajo que el de células M (Fig. R11b), lo que indica que la progresión tumoral requiere de la selección de células con la biogénesis mitocondrial reprimida.

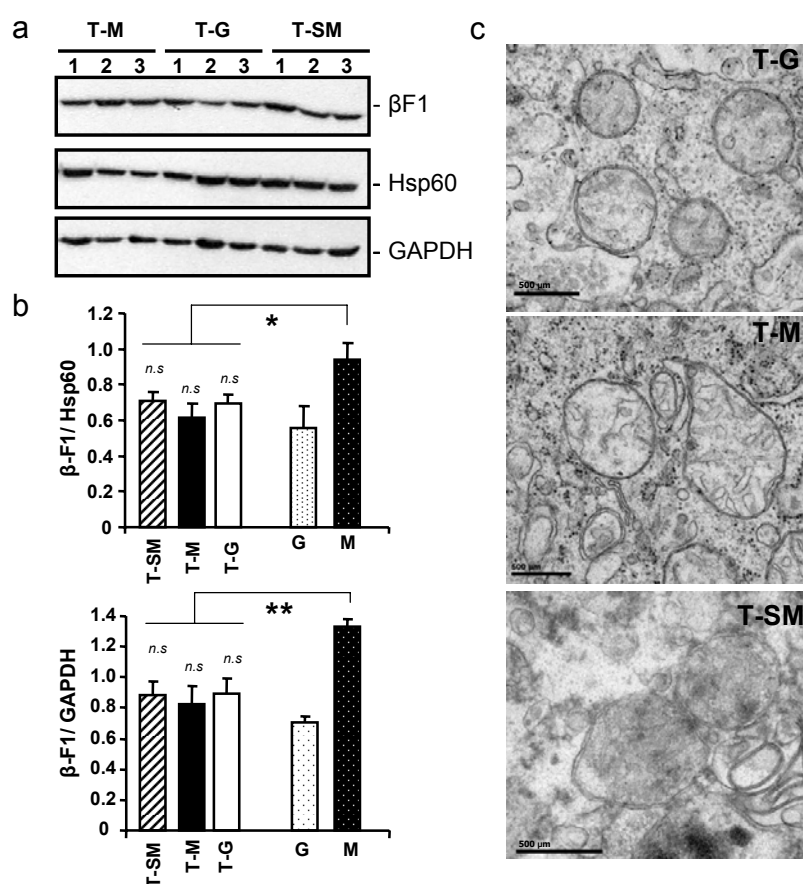


Figura R11. Los tumores derivados de los tres fenotipos bioenergéticos de células HCT116 tienen la misma huella mitocondrial. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se inocularon en el flanco derecho trasero de ratones desnudos y los tumores desarrollados se analizaron por *western blot* (a-b) y microscopía electrónica (c). (a) Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas β -F1-ATPasa, Hsp60, y GAPDH en tres preparaciones (carriles 1-3) de muestras tumorales derivadas de la implantación de células M (T-M), G (T-G) y SM (T-SM). Los histogramas en (b) representan la media \pm SEM de los índices bioenergéticos β -F1/Hsp60 y β -F1/GAPDH en T-M (n=9-12), T-G (n=11-16), T-SM (n=7-10), así como en las muestras de células parentales G (n=8-11) y M (14-15). * y **, $p < 0.05$; $p < 0.001$ al comparar frente a M, respectivamente. n.s., no-significativo al comparar frente a células G. (c) Secciones ultrafinas de tumores T-G, T-M y T-SM se procesaron por técnicas de microscopía electrónica tal y como se describe en materiales y métodos (ver sección 3.2.2.1). El análisis de las estructuras celulares en los tumores muestra la presencia de mitocondrias redondeadas que carecen de crestas y se asemejan a los orgánulos observados en células G.

La observación detallada de cortes de microscopía electrónica de las muestras tumorales (T-G, T-M, y T-SM) (Fig. R11c) reveló la existencia de orgánulos de morfología redondeada y carentes de crestas mitocondriales muy similares a los observados en células G (Fig. R2). Estos resultados indican que desde el punto de vista del fenotipo mitocondrial los tumores obtenidos de los animales son idénticos entre sí y análogos a las células G.

Para avalar estas conclusiones, analizamos los perfiles de expresión génica de los tumores T-M y T-G mediante micromatrices de DNA usando la plataforma “Human Genome U133 Plus 2.0” de Affymetrix. Se realizaron tres micromatrices por cada condición

Para avalar estas conclusiones, analizamos los perfiles de expresión génica de los tumores T-M y T-G mediante micromatrices de DNA usando la plataforma “Human Genome U133 Plus 2.0” de Affymetrix. Se realizaron tres micromatrices por cada condición

experimental (T-M y T-G) procedentes de tres muestras tumorales independientes. El análisis comparado de las seis muestras bajo las dos condiciones experimentales proporcionó una lista de sondas que presentaban diferencias de expresión entre los tumores M y G (Partek II suministrado en soporte digital). La uniformidad de los datos resultantes y el procesamiento estadístico se analizó de forma idéntica a la ya descrita en el apartado 4.1.4. En este estudio normalizamos los datos frente a la media geométrica de las muestras pertenecientes a la condición T-M. Se obtuvieron 1,347 secuencias significativas en la comparación no emparejada entre T-M y T-G que agrupadas según los criterios del consorcio Gene Ontology (GO) para los Procesos Biológicos y Funciones Moleculares proporcionó una lista final de 1,228 genes diferencialmente expresados entre las dos condiciones tumorales. La Tabla A1 en Anexo I contiene los genes más sobresalientes de este análisis, estando la mayoría de ellos implicados en procesos de vascularización, angiogénesis y dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, debemos destacar que a diferencia del análisis de expresión génica entre células M y G, la aplicación de los diferentes test de corrección múltiple no proporcionó ninguna secuencia significativamente afectada en su expresión entre los tumores T-M y T-G lo que sugiere la identidad entre ellos.

La ausencia de cambios significativos en la expresión génica entre los tumores derivados de células M y G quedó confirmada mediante qPCR a tiempo real (Fig. R12).

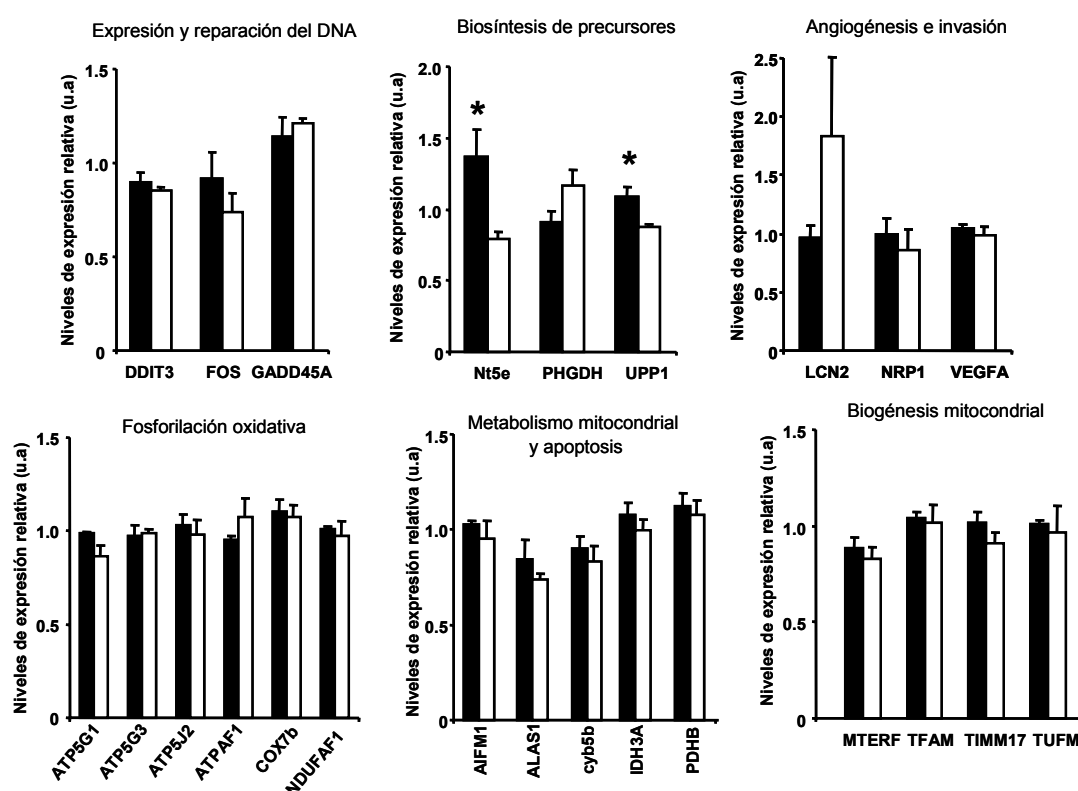


Figura R12. El análisis por qPCR confirma la identidad de los tumores T-G y T-M. Los tumores derivados de células M (T-M) y G (T-G) se usaron para el análisis por RT-PCR. Los niveles de expresión relativa se normalizaron usando el criterio del algoritmo Normfinder respecto a la expresión del gen BNIP3 determinada también por qPCR. Los histogramas representan la media±SEM de 3 réplicas biológicas para T-M (barras negras) y T-G (barras blancas). *, p< 0,001 al comparar frente a T-M.

En conjunto, estos resultados sugieren que los tumores producidos de células M y SM se desarrollan tras seleccionarse *in vivo* a fenotipo G, y que por tanto las células con fenotipo M y SM no tienen capacidad tumoral per sé.

4.1.7. La adquisición del fenotipo G es reversible.

Con el propósito de verificar si la selección *in vivo* del fenotipo glucolítico era una adaptación de la célula al ambiente particular en el que se desarrolla el tumor, analizamos el fenotipo bioenergético de células G y SM tras cultivarlas durante 12 días en ausencia de los tratamientos correspondientes (OL y 2-DG). Se determinó el flujo glucolítico y se observó que en ambos tipos celulares la tasa de glucolisis aerobia recuperaba los valores típicos de las células M a los 6 días de lavado y que ésta se mantenía constante a los 12 días después de retirar los agentes inductores del correspondiente fenotipo (Fig. R13a). Del mismo modo, se determinó la respiración sensible a oligomicina de las células lavadas y se observó que no era significativamente distinta de la respiración observada en las células M-control (Fig. R13b). Estos resultados son consistentes con los obtenidos del análisis del índice bioenergético (Fig. R13c). Así, el cociente β -F1/GAPDH de células SM lavadas reveló una disminución significativa cuando se compara con las células SM originales y el índice de células G lavadas experimentó un aumento significativo al ser comparado con las G originales; siendo, en ambos casos, próximo al cociente característico de las células parentales M (Fig. R13c). Estos resultados apoyan que el fenotipo metabólico (glucolítico) de la célula tumoral es una característica reversible.

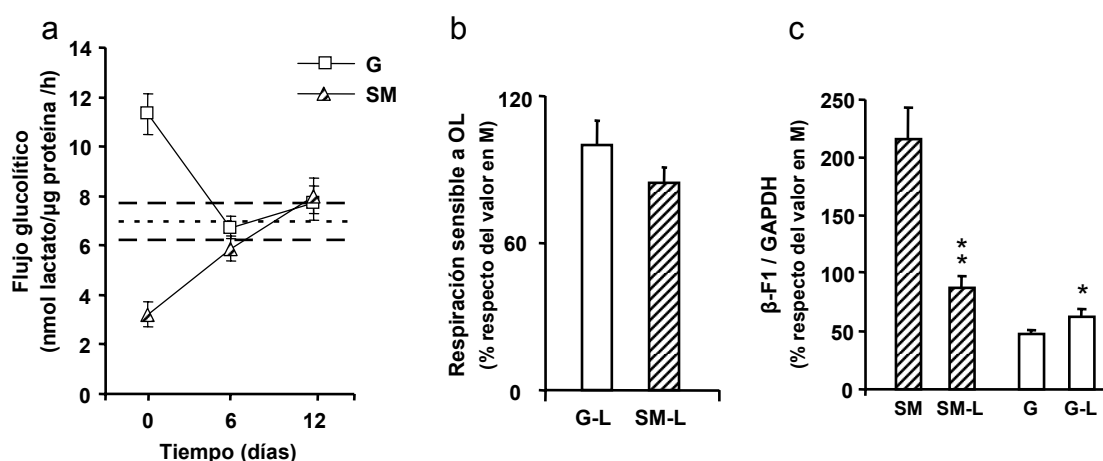


Figura R13. El fenotipo metabólico de la célula tumoral es una característica modulable. Células tratadas con 2DG (SM) y OL (G) se mantuvieron en cultivo en ausencia de los correspondientes tratamientos durante 12 días consecutivos para la determinación de la tasa de glucolisis aerobia (a), la respiración sensible a OL (b) y la huella bioenergética (β -F1/GAPDH) (c). El gráfico en (a) muestra la media \pm SEM de 12 determinaciones independientes para células G y SM. La línea punteada representa el valor medio de glucolisis aerobia de las células M con sus correspondientes SEM (líneas discontinuas superior e inferior). (b) La RSO se determinó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA) (ver sección 3.2.3.2 de materiales y métodos) tras la adición de OL (6 μ M). Las barras representan la media \pm SEM de 18 determinaciones independientes en células G lavadas (G-L) y 15 en SM lavadas (SM-L). Los histogramas en (c) representan la media \pm SEM del índice bioenergético β -F1/GAPDH determinado por *western blot*; n= 11 y n= 8 para células SM parentales y lavadas (SM-L), respectivamente; n=11 y n=9 para células G parentales y lavadas, respectivamente. * y **, p<0.05 y p<0.001 al comparar frente a las parentales en cada caso.

4.1.8. El metabolismo energético aporta una diana para el tratamiento del cáncer.

Estudios recientes proponen que el metabolismo de las células cancerígenas puede aportar una nueva diana para el desarrollo de estrategias antitumorales (Garber, 2006; Kroemer y Pouyssegur, 2008). Por esto, el siguiente paso en este estudio ha sido ensayar el efecto que diversos agentes que interfieren con el metabolismo energético celular tienen sobre tumores inducidos en ratones inoculados con células G (Fig. R14). Usamos el 5-fluorouracilo (5-FU) como agente quimioterapéutico clásico. Esta molécula interfiere la síntesis de DNA por inhibición de la actividad timidilato sintetasa y fue introducido en 1957 por Heidelberger y cols. en el uso clínico para el tratamiento de tumores sólidos de colon. Por otro lado, probamos dos inhibidores del metabolismo glucolítico cuya eficacia en regresión tumoral ha sido testada por otros investigadores (Geschwind y cols., 2002; Ko y cols., 2004; Xu y cols., 2005; Kim y cols., 2007b), el 3-bromo-piruvato (3-BrP) que bloquea la producción de ATP en la célula mediante la inhibición de la actividad de la enzima hexokinasa (HK), y el iodoacetato (IAA) que bloquea la glucólisis a nivel de la enzima GAPDH. Basándonos en un estudio reciente (Bonnet y cols., 2007), también seguimos la estrategia de activar la función mitocondrial en las células tumorales mediante el tratamiento con dicloroacetato (DCA). Este compuesto inhibe a la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK) que actúa como modulador negativo del complejo enzimático PDH. Se llevó además un grupo de animales tratados con NaCl como control en paralelo en los experimentos.

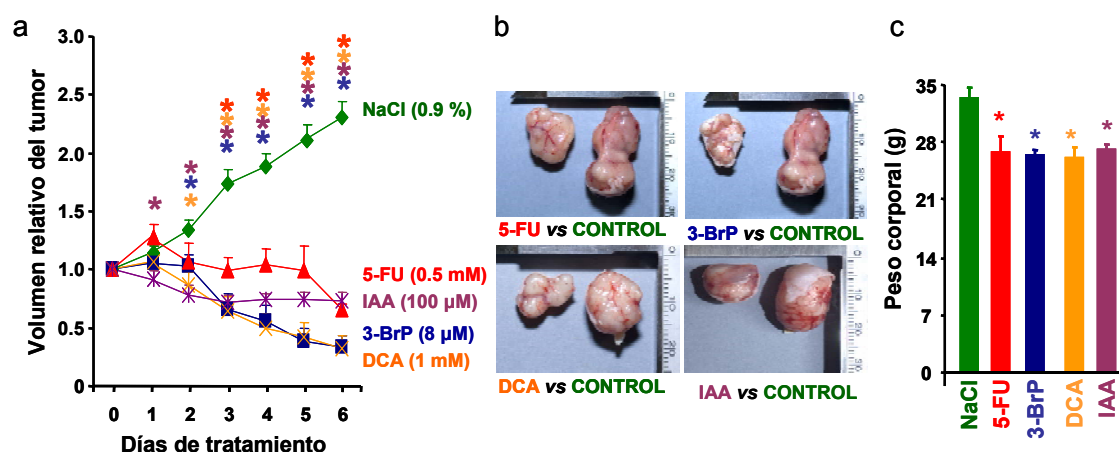


Figura R14. El metabolismo energético supone una diana efectiva para el tratamiento del cáncer. Células tratadas con OL (G) se inocularon en ratones desnudos (10^7 células por animal) para la inducción de tumores. Una vez que el tumor alcanzó un volumen de ~ 1 cm³, los animales recibieron inyecciones diarias de 8 µM 3-BrP (n=10, azul), 0.5 mM 5-FU (n= 5, rojo), 1mM DCA (n=10, naranja), o 100 µM IAA (n=7, morado) durante 6 días consecutivos. Un grupo inyectado diariamente con 0.9 % NaCl se llevó en paralelo como control (n=6, verde). **(a)** Se representa el volumen del tumor normalizado respecto al tamaño del mismo antes del inicio de los tratamientos. *, $p < 0.05$ al comparar frente al grupo control tratado con NaCl. **(b)** Las imágenes ilustran un ejemplo del tamaño del tumor tras los respectivos tratamientos en comparación con el tamaño alcanzado por los tumores de los ratones control. **(c)** Los histogramas representan la media \pm SEM del peso de los animales (g) tras los distintos tratamientos. *, $p < 0.05$ al comparar frente a los ratones control tratados con NaCl.

El grupo de ratones control experimentó un crecimiento progresivo del tumor que alcanzó un tamaño de 2.5 veces el inicial a los 6 días (Fig. R14a y b). Tanto el 5-FU como el IAA fueron capaces de reducir en casi un 30% el tamaño del tumor a los 6 días de tratamiento (Fig. R14a y b). Los tratamientos con 3-BrP y DCA mostraron una disminución del 50% del volumen tumoral en el mismo tiempo (Fig. R14a y b). Los compuestos presentaron distinta eficacia antitumoral, pero el efecto que produjeron sobre los animales en cuanto a la reducción del peso corporal fue muy similar (Fig. R14c). Estos resultados demuestran que los agentes no-convencionales (IAA, 3-BrP y DCA) son al menos tan eficaces como los quimioterapéuticos clásicos (5-FU) en el tratamiento del cáncer colorrectal, y por tanto, validan el uso del metabolismo energético de la célula tumoral como diana para el diseño de estrategias que ayuden a combatir la progresión de la enfermedad.

Con el fin de esclarecer el mecanismo por el que estos agentes promueven la regresión tumoral estudiamos su efecto sobre la inducción de muerte celular en células G, M y SM. Usamos la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) que permite discriminar aquellas poblaciones de células positivas a anexina (apoptóticas) de las necróticas (anexina negativas y positivas a IP) (Fig. R15).

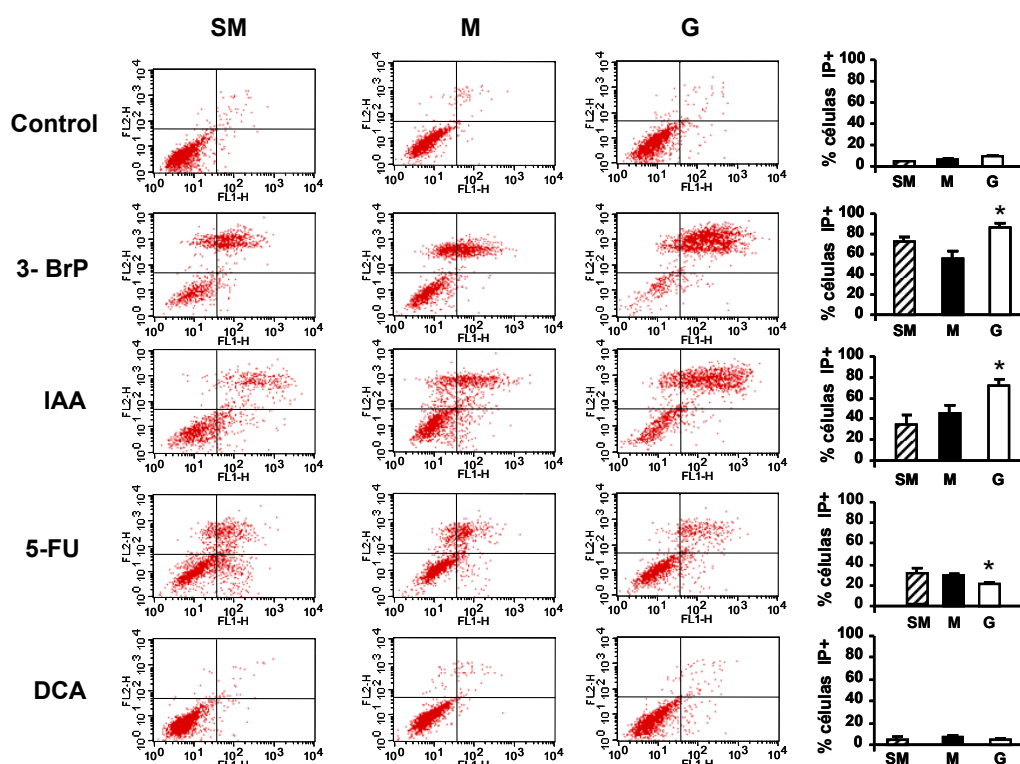


Figura R15. El fenotipo bioenergético de las células HCT116 condiciona su respuesta a muerte celular. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se cultivaron en presencia o ausencia de los siguientes agentes: 8μM 3-BrP, 100 μM IAA, 10 μM 5-FU, o 1mM DCA. Las células se tiñeron con anexina V-FITC (50μg/ ml) y yoduro de propidio (100μg/ ml) y se analizaron por citometría de flujo. El cuadrante inferior izquierdo representa las células vivas, el cuadrante inferior derecho las células en apoptosis temprana, y el cuadrante superior derecho las células sufriendo necrosis. Los histogramas de la derecha representan la media±SEM de la cuantificación de células positivas a yoduro de propidio (cuadrante superior derecho e izquierdo) en dos experimentos independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a M.

Observamos que en respuesta a los inhibidores glucolíticos 3-BrP y IAA la muerte celular era negativa a la tinción temprana de anexina (Fig. R15), lo que sugiere una muerte de tipo necrótico. En efecto, no detectamos fragmentación del DNA por citometría de flujo, ni activación de caspasa 3 por técnicas de luminiscencia (datos no mostrados) en respuesta a estos agentes alquilantes, confirmando así la inducción de muerte celular por necrosis. Asimismo, observamos una gran diferencia en el porcentaje de muerte entre los distintos fenotipos bioenergéticos siendo masiva en respuesta a los inhibidores glucolíticos en las células con fenotipo G (Fig. R15). El 5-FU resultó ser más eficaz en matar por apoptosis células con mayor expresión de β -F1 (SM) (Fig. R15 y Fig. R7). Sorprendentemente, y en contra de trabajos de otros autores que describen al DCA como un inductor de apoptosis en células tumorales (Bonnet y cols., 2007), fuimos incapaces de detectar ningún tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) en nuestro sistema celular con la dosis de DCA empleada (Fig. R15 y R16). La doble tinción de preparados celulares con Hoechst y yoduro de propidio (Fig. R16) confirmó los resultados de muerte celular obtenidos por técnicas de citometría de flujo para los agentes estudiados, enfatizando la progresiva inducción de una muerte necrótica a medida que aumenta el fenotipo glucolítico de la célula en respuesta a 3-BrP y IAA, y una mayor muerte celular por apoptosis a medida que aumenta la expresión de β -F1ATPasa en las células en respuesta a 5-FU (Fig. R16).

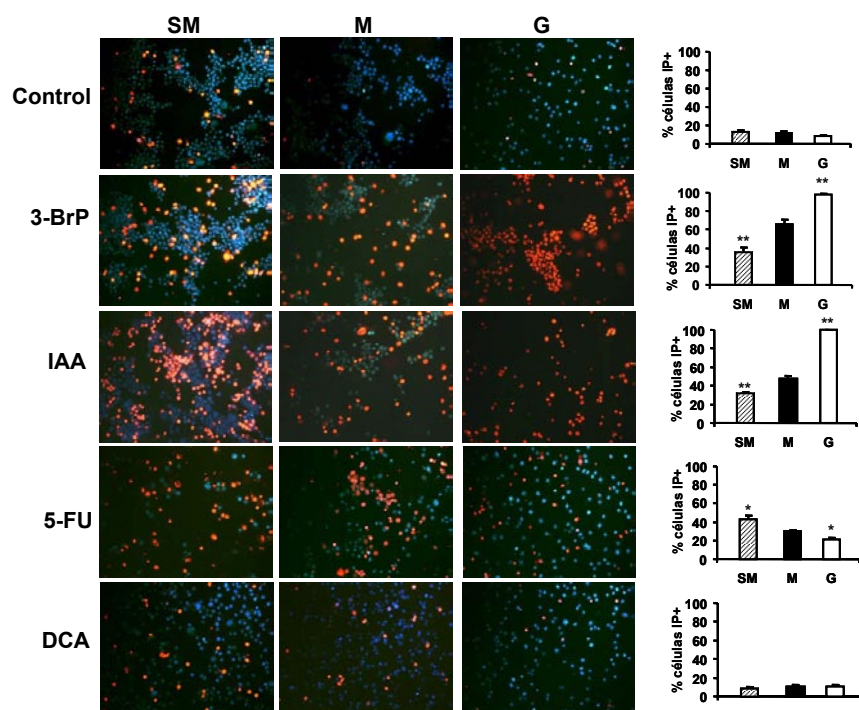


Figura R16. La muerte celular es dependiente del metabolismo energético prevalente en la célula. Células tratadas con 2DG (SM), OL (G) y sin tratar (M) se cultivaron en medio Mc Coy's 5A en presencia o ausencia de los siguientes agentes: 8 μ M 3-BrP, 10 μ M 5-FU, 1mM DCA, o 100 μ M IAA. Las células se tiñeron con Hoechst 33342 (1mg/ml) y yoduro de propidio (1 μ g/ml) y se visualizaron al microscopio de fluorescencia (x 20). El estudio de diversos campos tomados

aleatoriamente muestra que los inhibidores glucolíticos inducen muerte de forma masiva en las células más glucolíticas (células G), mientras que el 5-FU es más eficaz en matar a las células con mayor función mitocondrial (células SM). Los histogramas de la derecha representan la media \pm SEM de la cuantificación de células positivas a yoduro de propidio (células rojas) en cada uno de los tratamientos en dos experimentos independientes. * y **, $p < 0.05$; $p < 0.001$ al comparar frente a M.

4.1.9. El DCA frena la proliferación celular y revierte el fenotipo glucolítico.

La ausencia de muerte celular *in vitro* en respuesta a DCA nos llevó a preguntarnos cuál sería el mecanismo de acción de este agente como antitumoral. El tratamiento de las células G con 10 mM de DCA promueve una parada en la proliferación celular a las 24h y 48h post-tratamiento (Fig. R17a). La cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo reveló una disminución significativa en G2/M y S, y un incremento en G1 tras el tratamiento con el compuesto (Fig. R17b). Sin ser suficiente como para justificar una inducción significativa de apoptosis mediada por DCA (Fig. 15 y 16), sí observamos un ligero aumento en la fase sub-G1 en las células tratadas (Fig. R17b). Estos resultados sugieren que el mayor impacto del DCA como antitumoral en nuestro sistema se debe a la inhibición de la proliferación celular.

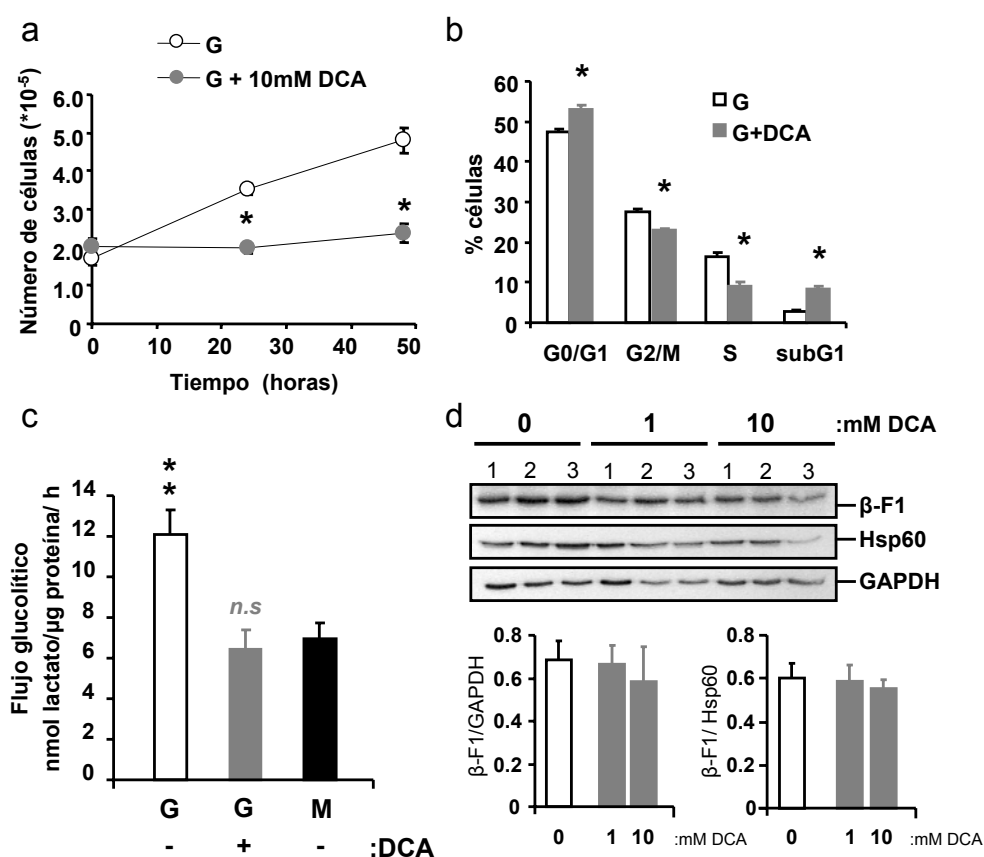
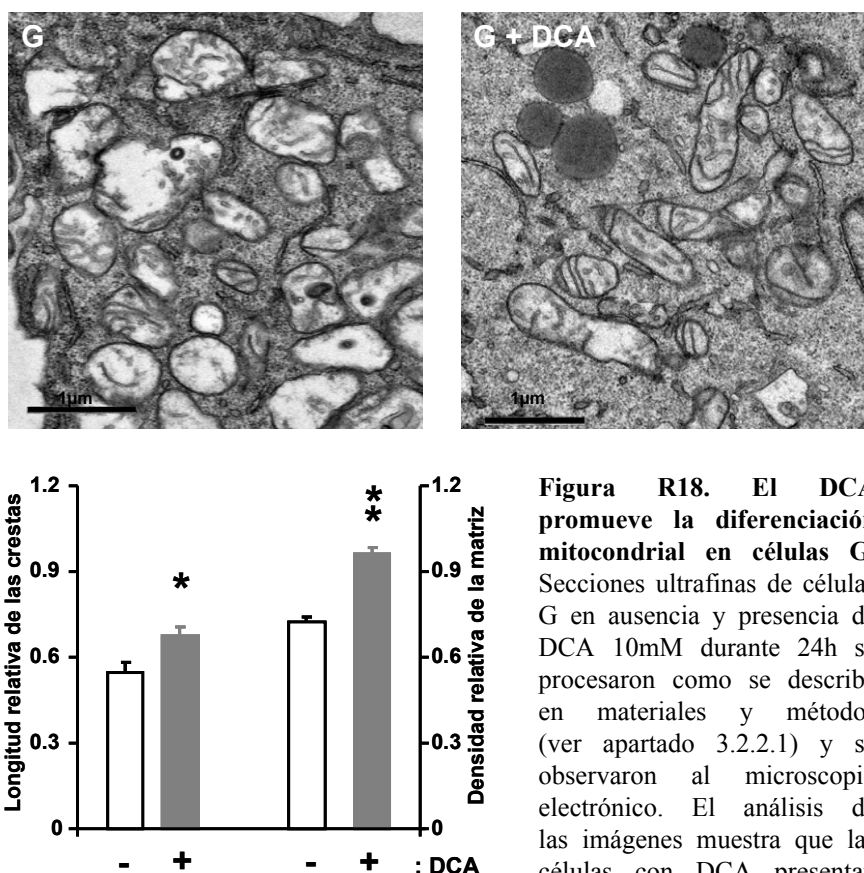


Figura R17. El tratamiento con DCA frena la proliferación celular y cambia el fenotipo metabólico de células G. Células tratadas con OL (G) se cultivaron en ausencia (blanco) o presencia (gris) de DCA 10mM. **(a)** La proliferación celular se determinó a distintos tiempos usando un hemocitómetro convencional. **(b)** Determinación por citometría de flujo de la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular a las 24h de tratamiento con DCA. Los resultados representan la media \pm SEM de 4 **(a)** y 3 **(b)** determinaciones independientes. *, $p < 0.05$ al comparar frente a G. **(c)** Las células se trataron con DCA como se indica durante 24h y se usaron para la determinación del flujo glucolítico estimando la producción de lactato por microgramo de proteína celular y por hora. La tasa de glucolisis aerobia en células M se incluye como referencia. Los histogramas representan la media \pm SEM de 6 determinaciones independientes. **, $p < 0.001$ al comparar frente a M. n.s., no significativo al comparar frente a M. **(d)** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas β -F1-ATPasa, Hsp60, y GAPDH en tres preparaciones (carriles 1-3) de células G tratadas con 1 o 10mM de DCA y sin tratamiento. Los histogramas en representan la media \pm SEM de los índices bioenergéticos β -F1/GAPDH; y β -F1/Hsp60 en dos experimentos diferentes.

Consistente con este efecto sobre el crecimiento celular se observa que el flujo glucolítico de las células G tratadas con DCA revierte a fenotipo M (Fig. R17c). Sin embargo, en este caso no se producen cambios en la expresión de los marcadores bioenergéticos (Fig. R17d), lo que sugiere que la disminución del flujo glucolítico en las células tratadas con DCA se está regulando por control alostérico de las enzimas glucolíticas.

El análisis de la estructura mitocondrial por microscopía electrónica reveló la existencia de poblaciones de orgánulos muy heterogéneas en las células G tratadas con DCA (Figura R18). Se aprecian orgánulos característicos de células G coexistiendo con mitocondrias provistas de más invaginaciones de membrana interna y mayor densidad de la matriz (Figura R18). En conjunto, estos resultados sugieren que el DCA además de inhibir la proliferación celular, promueve un cambio en el fenotipo mitocondrial de la célula que posiblemente repercuta en la viabilidad de la célula tumoral.



mitocondrias con invaginaciones de la membrana interna y mayor densidad de la matriz. Los histogramas representan la media±SEM de 83 y 90 determinaciones de la longitud relativa de las crestas; y 210 y 150 determinaciones de la densidad relativa de la matriz en células G, y G+DCA, respectivamente. * y **, $p < 0.05$; $p < 0.001$ al comparar frente a G, respectivamente.

4.2. Carcinoma hepatocelular humano (CHC).

Los carcinomas hepatocelulares presentan una disminución general en la expresión de componentes de la mitocondria (β -F1-ATPasa, Hsp60 y mtDNA) a diferencia de la disminución específica que se produce en el componente bioenergético en carcinomas colorrectales (de Heredia y cols., 2000; Cuezva y cols., 2002). Se ha sugerido que en estos carcinomas (CHC) la proliferación promueve una “dilución” del contenido mitocondrial de la célula a medida que el tumor se desarrolla (Cuezva y cols., 2002). Con el objetivo de analizar la contribución de la función bioenergética de la mitocondria en carcinomas hepáticos nos propusimos el estudio de la línea celular HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano.

4.2.1. El fenotipo bioenergético de la línea celular HepG2.

Tratamos las células HepG2 con OL durante 48h y analizamos el perfil bioenergético resultante. Este tratamiento promueve un rápido y drástico aumento del flujo glucolítico llegando a triplicar la tasa de glucólisis aerobia de las células no tratadas (Fig. R19a).

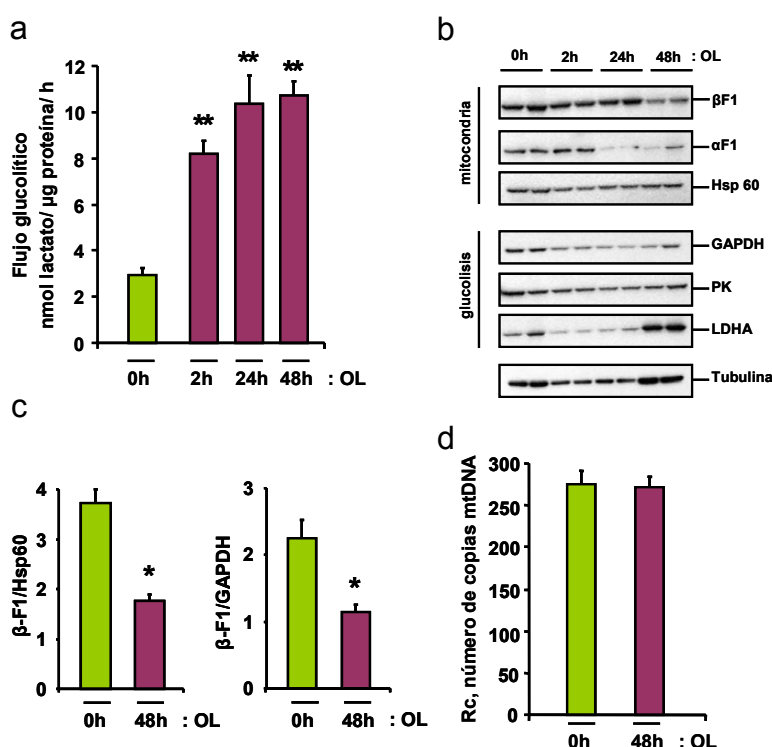


Figura R19. Regulación del fenotipo metabólico de las células HepG2.

Las células HepG2 se trataron con oligomicina (OL) 6μM a distintos tiempos según se indica. **(a)** Determinación del flujo glucolítico mediante la estimación del lactato producido por microgramo de proteína celular y por hora. Los histogramas representan la media±SEM de 6 determinaciones independientes en las células sin tratar (verde), y 10, 4 o 4 determinaciones independientes para las células tratadas 2, 24 y 48 h con OL (morado), respectivamente. **, $p < 0.001$ al comparar frente a células sin tratar. **(b)**

Análisis por *western blot* de la expresión de las proteínas mitocondriales: β -F1-ATPasa, α -F1-ATPasa y Hsp60, y las enzimas glucolíticas: GAPDH, PK (piruvato quinasa) y LDHA (lactato deshidrogenasa A) en dos preparaciones de células de cada condición. La expresión de α -tubulina se incluye como control de carga de los geles. Los histogramas en **(c)** representan la media±SEM de los índices bioenergéticos β -F1/Hsp60 y β -F1/GAPDH en células sin tratar (0h) y tratadas 48h con OL; $n = 4$ determinaciones independientes en dos experimentos distintos. *, $p < 0,05$ al comparar frente a 0h. **(d)** Cuantificación del número de copias de mtDNA relativa al DNA nuclear en muestras de células HepG2 sin tratar (0h) y tratadas 48h con OL. Los histogramas representan la media±SEM de 15 determinaciones independientes en cada condición.

Para relacionar esta alteración metabólica con cambios en el proteoma del metabolismo energético celular analizamos la expresión de marcadores mitocondriales y glucolíticos después del tratamiento (Fig. R19b). La OL indujo una clara disminución en la expresión de las proteínas β -F1-ATPasa (48h) y α -F1-ATPasa (24h y 48h) sin afectar la expresión de la proteína estructural de la mitocondria Hsp60 (Fig. R19b). Tampoco encontramos cambios significativos en la expresión de los marcadores glucolíticos GAPDH y PK (Fig. R19b). Sin embargo, el tratamiento con OL produjo un claro aumento en la expresión de LDHA a las 48h (Fig. R19b). La expresión del marcador α -tubulina sirve como control de carga de los experimentos (Fig. R19b). De esta forma, los índices proteómicos que estiman la competencia bioenergética de la mitocondria (β -F1-ATPasa/Hsp60) y potencial mitocondrial global de la célula (β -F1-ATPasa/GAPDH) resultaron significativamente disminuidos en células tratadas 48h con OL (Fig. R19c). Sin embargo, el tratamiento no afectó el número de copia del mtDNA de las células (Fig. R19d).

El tratamiento de las células con OL produjo una drástica reducción del consumo de oxígeno celular, tanto de la respiración sensible a OL (Fig. R20a), lo que está de acuerdo con la pérdida de expresión del complejo V (Fig. R19b), como de la respiración máxima inducida por FCCP (Fig. R20a). Este último resultado indica una afectación de la cadena respiratoria y función mitocondrial global por el tratamiento con OL. De forma congruente, se observó una disminución del 50% en la expresión de la proteína cuello de botella de la oxidación del piruvato PDH (subunidad E1 α) (Fig. R20b).

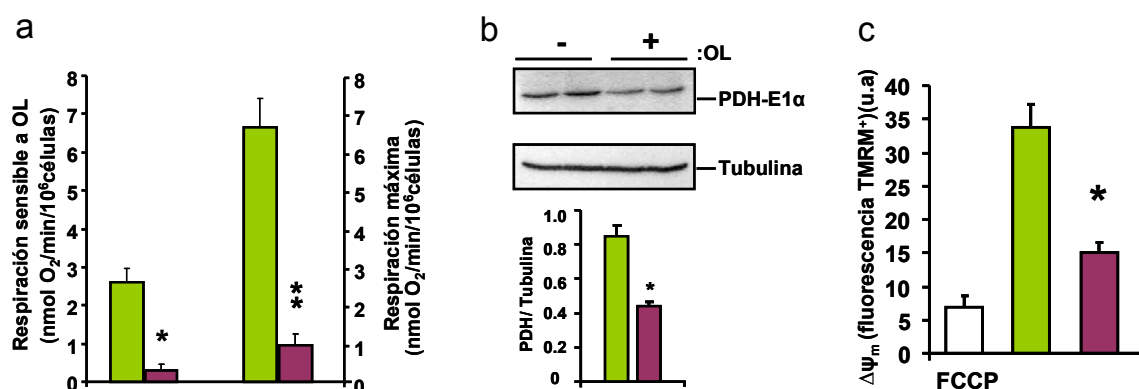


Figura R20. El tratamiento de células HepG2 con OL resulta en la pérdida de funcionalidad mitocondrial. Las células HepG2 se trataron en ausencia (barras verdes) o presencia (barras moradas) de oligomicina (OL) 6 μ M durante 48h y se procesaron para la determinación de la tasa de consumo de oxígeno celular **(a)**, *western blot* **(b)** y potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) **(c)**. **(a)** Medida del consumo de oxígeno celular tras la adición de 6 μ M OL (Respiración sensible a OL) y 2 μ M FCCP (Respiración máxima). Las barras representan la media \pm SEM de 6, y 7 determinaciones independientes en células sin tratar (verde), y tratadas con OL (morado), respectivamente. *, y **, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ al comparar frente a células no tratadas. **(b)** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas PDH (piruvato deshidrogenasa, subunidad E1 α), y α -tubulina. Los histogramas en la parte inferior muestran la media \pm SEM del índice PDH/ tubulina en 2 determinaciones independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a células sin tratar. **(c)** Determinación de $\Delta\psi_m$ mediante citometría de flujo usando la sonda TMRM⁺ (0.5 μ M). Se midió también el $\Delta\psi_m$ en células tratadas con el desacoplante FCCP (5 μ M) durante 30 minutos. El histograma muestra la media \pm SEM de 10 determinaciones independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a células sin tratar.

Además, estos cambios se traducen en que las células tratadas con OL tienen un potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales menor que las células sin tratamiento (Fig. R20c), lo que pone de manifiesto una menor funcionalidad del orgánulo en estas células.

El análisis de la expresión génica mediante qPCR de las células HepG2 puso de manifiesto que el tratamiento con OL disminuye la expresión de diversos genes mitocondriales implicados en metabolismo energético, fosforilación oxidativa, biogénesis y muerte celular respecto de las células sin tratamiento (Fig. R21). Es decir, estos resultados indican que el estrés promovido por OL favorece la aparición de un fenotipo de represión de la biogénesis mitocondrial. De forma congruente con lo descrito en las células HCT116 (Fig. R4), se observó una correlación inversa entre las razones β -F1-ATPasa/Hsp60 y β -F1-ATPasa/GAPDH y el flujo de glucólisis aerobia de las células ($R=-0,922$; $p<0,01$; $n=8$; $R=-0,825$; $p<0,05$; $n=8$), así como una correlación directa entre los índices bioenergéticos y la respiración sensible a OL ($R=0,845$; $p<0,01$; $n=8$; $R=0,707$; $p<0,05$; $n=8$), lo que pone de manifiesto una vez más que el consumo de glucosa de una célula depende de la función bioenergética de la mitocondria.

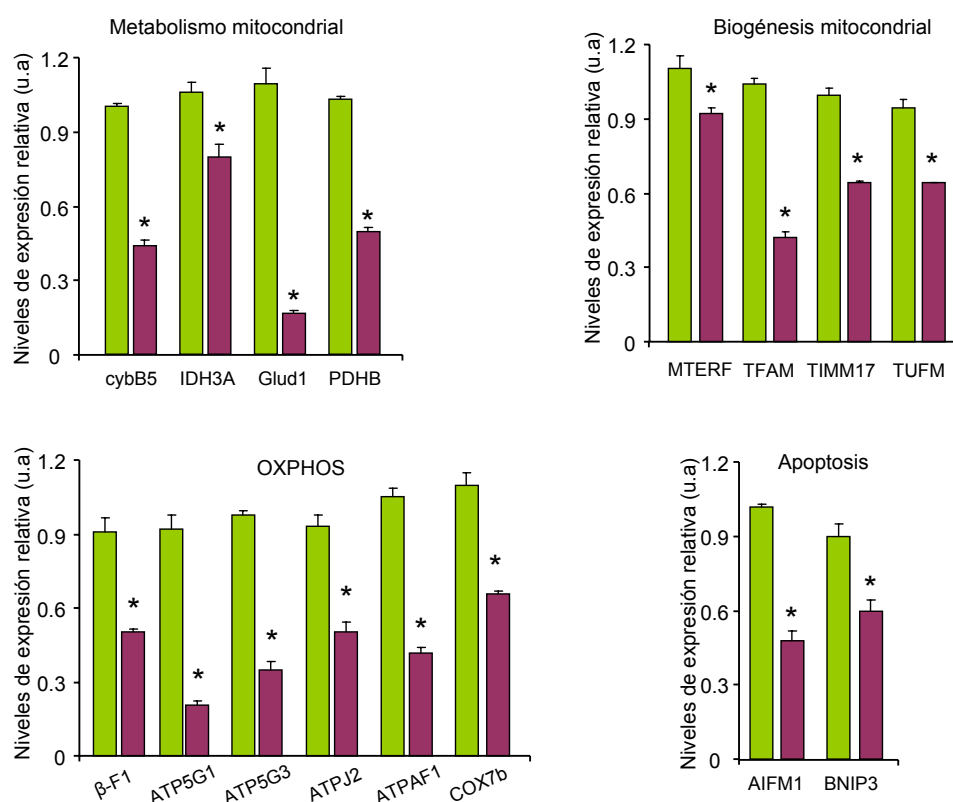


Figura R21. El análisis por qPCR a tiempo real apoya la represión de la biogénesis mitocondrial en células HepG2 tratadas con OL. Las células HepG2 se trataron en ausencia o presencia de oligomicina (OL) 6 μ M durante 48h y se emplearon para la extracción de RNA y posterior análisis por RT-PCR. Los niveles de expresión relativa se normalizaron usando el criterio del algoritmo Normfinder respecto a la expresión de los genes PHGDH y NDUFAF determinada también por qPCR. Los histogramas representan la media \pm SEM de 3 réplicas biológicas para células HepG2 sin tratar (barras en verde) y tratadas 48h con OL (barras en morado). *, $p<0,001$ al comparar frente a células sin tratar.

De igual forma que en las células HCT116, definimos las células control como M, por tener función mitocondrial y las células tratadas 48h con OL como G, por haber adquirido un fenotipo más glucolítico. Contrariamente a lo descrito para las células HCT116, el fenotipo glucolítico de las células G en este tipo celular no es reversible, ya que la tasa de glucolisis aerobia se mantiene tras 1, 2 y 6 días de lavado de la OL (Fig. R22).

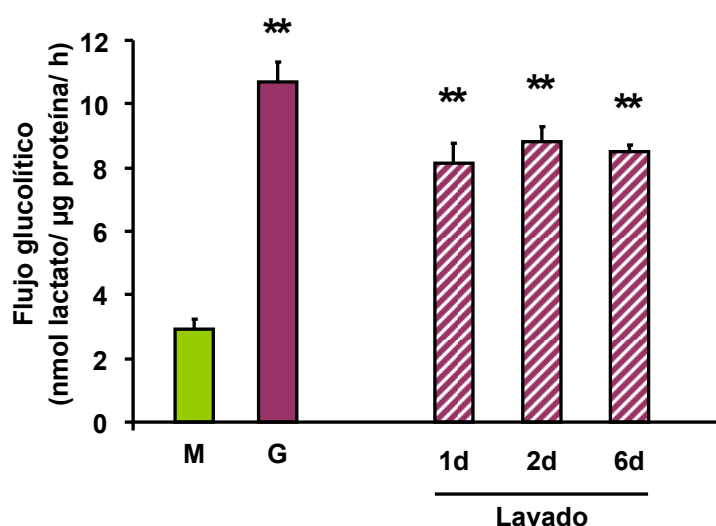


Figura R22. El fenotipo glucolítico de las células G no es reversible. Células tratadas con OL (G) se mantuvieron en ausencia del tratamiento en el medio de cultivo para la determinación de la tasa de glucolisis aerobia a distintos tiempos (1, 2 y 6 días) mediante la estimación del lactato producido por microgramo de proteína celular y por hora. Los histogramas representan la media±SEM de 5 determinaciones independientes. Se incluyen los datos correspondientes a las células M y G parentales como referencia. **, $p < 0.001$ al comparar frente a células M.

4.2.2. La dimerización de la ATP sintasa participa en la formación de crestas mitocondriales.

Los resultados indican una profunda alteración en la fosforilación oxidativa como consecuencia del tratamiento con OL. Por este motivo estudiamos la expresión de las proteínas β -F1-ATPasa y Hsp60 por técnicas de inmunomicroscopía electrónica. Se realizó el doble marcaje con partículas de oro coloidal de 10nm y 15nm para la detección de β -F1-ATPasa y Hsp60, respectivamente (Fig. R23). Como se puede apreciar, las células M mostraron una gran cantidad de señal de oro de β -F1 (Fig. R23a) mientras que en las células G apenas se detectó marca para esta proteína (Fig. R23b). No se apreciaron cambios significativos en la expresión de Hsp60 entre los dos tipos celulares (Fig. R23 a-c) confirmando los resultados del análisis del fenotipo mitocondrial por *western blot* (Fig. R19). Estos resultados indican que la transformación de células M en G se produce por una desdiferenciación bioenergética del orgánulo que se puede evaluar por la disminución de la razón β -F1/ Hsp60 en *western blot* (Fig. R19b) y por orgánulo mediante técnicas de microscopía electrónica (Fig. R23c). Asimismo, y aunque la inclusión en Lowicryl no permite un análisis de la ultraestructura mitocondrial tan claro como la inclusión en Epon, detectamos una alteración evidente en la estructura de los orgánulos por la aparición en

células G de mitocondrias carentes de crestas mitocondriales (Fig. R23b). Además, se observaron mitocondrias con estructura “de tipo cebolla” entre los orgánulos de células G (Fig. R23d), como ya han descrito otros autores en modelos de levadura. Esta alteración ultraestructural de la mitocondria está asociada a la pérdida de expresión de subunidades de la ATP sintasa (Paumard y cols., 2002; Goyon y cols., 2008; Thomas y cols., 2008).

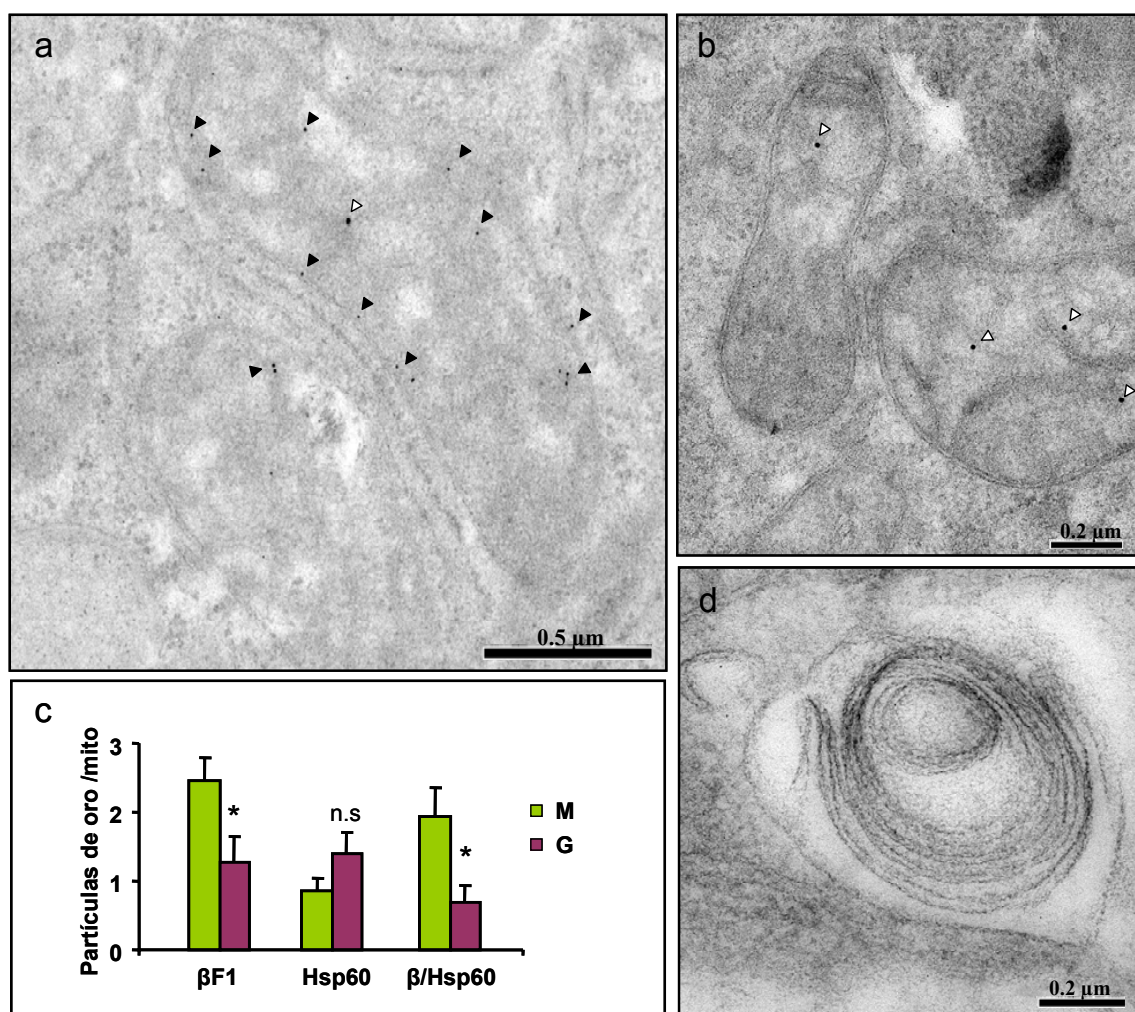


Figura R23. Las células G presentan alteraciones ultraestructurales de sus mitocondrias. Células tratadas con OL (G) y sin tratar (M) se procesaron para su estudio por microscopía electrónica. Criosecciones de muestras M y G (a-b) se estudiaron mediante inmunomarcaje de β -F1-ATPasa (oro coloidal 10nm; triángulos negros) y Hsp60 (oro coloidal 15nm; triángulos blancos). Los histogramas en (c) muestran la cuantificación del inmunomarcaje en mitocondria. Los resultados muestran la media \pm SEM del conteo en veinticinco inmunomicroscopías. *, $p < 0.05$ al comparar frente a células M. n.s., no significativo. (d) Mitocondria representativa de células G. En concreto, se aprecia la desorganización estructural de la membrana mitocondrial interna que origina la formación de orgánulos denominados “de tipo cebolla”.

Se ha descrito la existencia de una relación directa entre la dimerización de la ATP sintasa mitocondrial y la morfología de las crestas (Giraud y cols., 2002; Paumard y cols.,

2002; Minauro-Sanmiguel y cols., 2005; Goyon y cols., 2008; Strauss y cols., 2008). Por este motivo, en colaboración con la Dra. E. Guillou de nuestro grupo, analizamos la formación de dímeros de la ATP sintasa en células HepG2. El análisis mediante geles nativos “Blue Native” de la migración de los complejos proteicos en preparaciones de mitocondrias de células M y G (Fig. R24a-b) demostró la ausencia de dimerización de la ATP sintasa en las células G al evaluar estos dímeros mediante anticuerpos contra las subunidades β -F1- y α -F1-ATPasa (Fig. R24b). Estudios más recientes han propuesto que la sobreexpresión del inhibidor fisiológico de la H^+ -ATPasa, IF1, promueve la formación de dímeros y aumenta la densidad de crestas mitocondriales (Campanella y cols., 2008). Sin embargo, en nuestro sistema experimental un aumento en la cantidad relativa de la proteína IF1 respecto de la subunidad β -F1 de la ATP sintasa (Fig. R24c) produce el efecto contrario, es decir, ausencia de dimerización y de crestas mitocondriales, cuestionando de esta forma el papel de IF1 como regulador de la estructura de la mitocondria. En conjunto, estos resultados demuestran la importancia de la ATP sintasa en la formación de crestas mitocondriales en células de mamífero.

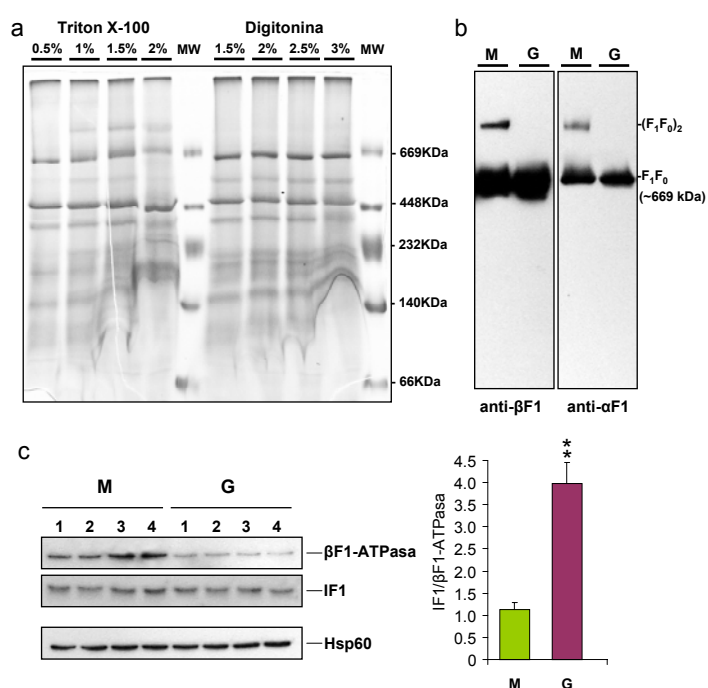


Figura R24. Las mitocondrias G carecen de dímeros de la ATP sintasa. Células tratadas con OL (G) y sin tratar (M) se analizaron mediante geles nativos “Blue Native” para evaluar la migración de los complejos proteicos de la ATP sintasa. **(a)** Análisis por Coomassie de las condiciones óptimas de solubilización de mitocondrias en células HepG2. Se usaron porcentajes crecientes de detergente, 0,5-2% para Triton X-100 y 1,5-3% para Digitonina. MW, marcadores de peso molecular. **(b)** Evaluación de los dímeros de ATP sintasa por *western blot* mediante el uso de anticuerpos contra las subunidades β -F1 y α -F1-ATPasa. **(c)** Análisis por *western blot* de la expresión

de las proteínas β -F1-ATPasa, IF1 y Hsp60 en 4 preparaciones (carriles 1-4) de mitocondrias M y G. Los histogramas representan la media \pm SEM de la expresión relativa IF1/ β -F1-ATPasa en dos experimentos independientes. **, $p < 0,001$ al comparar frente a células M.

4.2.3. El estrés mitocondrial frena el crecimiento de las células G.

Además de las alteraciones descritas, se observó una evidente transformación morfológica *in vitro* en las células HepG2 tratadas con OL. Como se ilustra en la Figura R25, las células control (M) son células epiteliales de morfología redondeada que crecen formando agregados celulares muy característicos (Fig. R25a). El tratamiento con OL

indujo un cambio fenotípico caracterizado por la aparición de células planas, alargadas y vacuolizadas (Fig. R25b). Por esto, el siguiente paso en nuestro estudio fue analizar el crecimiento de células M y G mediante la determinación del número de células presentes en el cultivo cada 24h (Fig. R26).

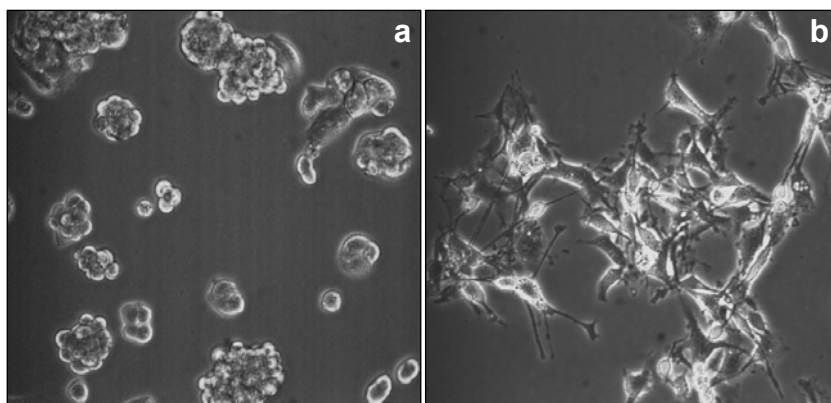


Figura R25. El tratamiento con OL promueve la transformación morfológica *in vitro* de las células G. La observación de células sin tratamiento (M) (**a**) y tratadas con OL (G) (**b**) mediante microscopía de contraste de fases (60X) pone de manifiesto el cambio fenotípico de las células G. Específicamente, se aprecian células planas, alargadas y vacuolizadas en comparación con los agregados celulares característicos de células M.

Del cociente entre las células vivas y las sembradas inicialmente se deriva un parámetro de crecimiento que estima la tasa de duplicación de celular (Fig. R26a). Este resultado muestra que las células G experimentan una parada de su proliferación (Fig. R26a), que por análisis del ciclo celular se observa que se produce por arresto de las mismas en la fase G0/G1 (Fig. R26b).

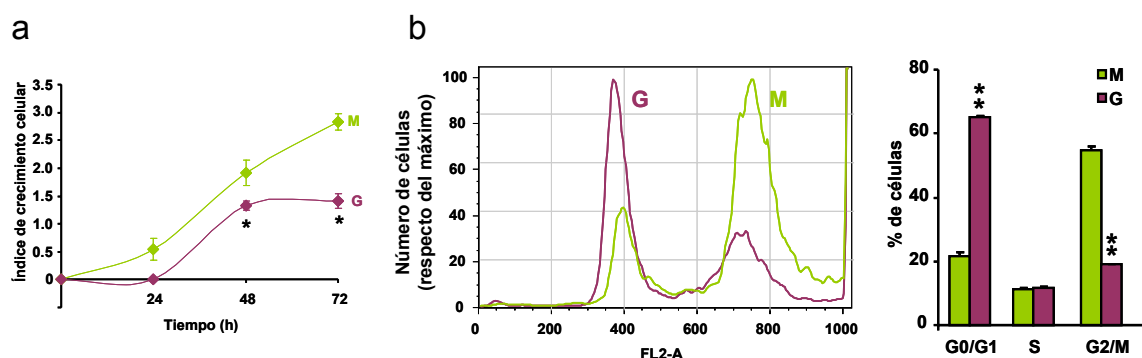


Figura R26. Las células G no proliferan *in vitro*. Células tratadas con OL (G, morado) y sin tratar (M, verde) se mantuvieron en cultivo durante varios días y se determinó su ritmo de crecimiento (**a**) mediante la estimación del índice de crecimiento celular (ver sección 3.2.4 de materiales y métodos). Los resultados son la media±SEM de 3 determinaciones independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a M. (**b**) Perfil representativo del ciclo celular en células M (en verde) y G (en morado) determinado por citometría de flujo. El solapamiento de ambos ciclos celulares muestra la enorme diferencia en la proporción de células acumuladas en G0/G1 y G2/M entre los dos fenotipos celulares. Los datos se representan normalizados respecto a la condición con un mayor número de células analizadas. Los histogramas representan la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular. Los resultados muestran la media±SEM de 4 determinaciones independientes. **, $p < 0,001$ al comparar frente a células M.

En conjunto, las alteraciones morfológicas observadas, la incapacidad de división *in vitro*, y el arresto en G1, sugieren que el estrés metabólico de las células HepG2 resulta en la inducción de un fenotipo de senescencia prematura.

4.2.4. Caracterización del fenotipo senescente de células G.

Diversos estudios describen la inducción de senescencia celular por una vía independiente del acortamiento gradual de telómeros y proponen el estrés impuesto por las condiciones de cultivo como uno de los estímulos responsables (Sherr y DePinho, 2000; Ramirez y cols., 2001). Para confirmar el fenotipo senescente de células G, estudiamos la expresión de un marcador universal de senescencia como es β -galactosidasa (Fig. R27). Como se puede apreciar, el porcentaje de células SA- β -gal positivas resultó significativamente más elevado en células G respecto de las células M (Fig. R27).

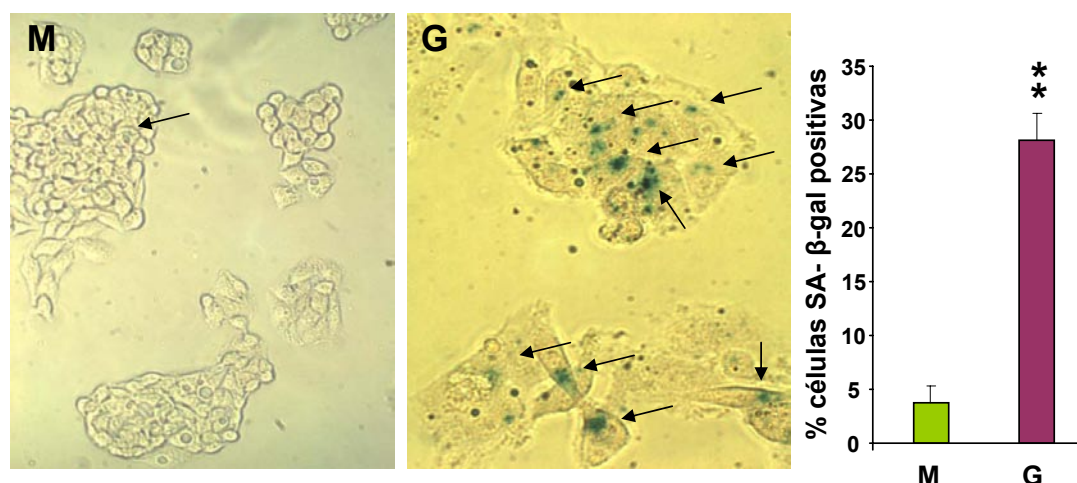


Figura R27. Análisis de la actividad β -galactosidasa en células HepG2. Células sin tratar (M) y tratadas con OL (G) se tiñeron con β -gal y se determinó la acumulación de células azules (marcadas con flechas negras) mediante microscopía de contraste de fases. La proporción de células con actividad β -galactosidasa se cuantificó mediante el conteo de células azules (SA- β -gal positivas) en diversos campos elegidos al azar. Los histogramas representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes. **, $p < 0,001$ al comparar frente a M.

La activación de vías de estrés oxidativo está considerada como uno de los estímulos inductores de senescencia prematura en células en cultivo (Parrinello y cols., 2003; Ksiazek y cols., 2006; Ksiazek y cols., 2008). Por este motivo analizamos la producción basal de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. Como se ilustra en la Figura R28a, las células G muestran una producción basal de ROS ~ 2 veces superior a la de las células M. Congruentemente con esta mayor producción de ROS observamos un nivel basal de carbonilación de las proteínas celulares superior en las células G (Fig. R28b).

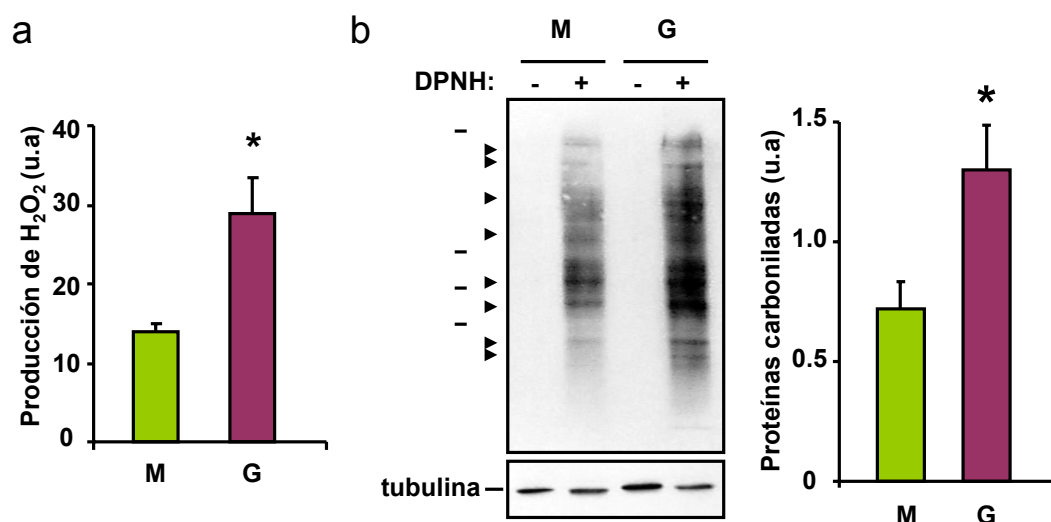


Figura R28. El fenotipo G muestra un mayor daño oxidativo. Células HepG2 tratadas con OL (G) y sin tratar (M) se analizaron por citometría de flujo para la determinación de la producción basal de H₂O₂ (**a**). Los histogramas muestran la media±SEM de dos experimentos independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a M. (**b**) Extractos de proteína de células de M y G (20µg) se derivatizaron en ausencia (-) o presencia (+) de DPNH y se procesaron para la identificación de grupos carbonilos de proteínas. La carga de las muestras se verificó mediante la expresión de la proteína α -tubulina por *western blot*. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la imagen (97, 66, 45 y 30 KDa). Las flechas negras indican las proteínas que se usaron en la cuantificación de la carbonilación proteica en los distintos tratamientos. Los histogramas son la media±SEM de ocho determinaciones. *, $p < 0,05$ al comparar frente a células sin M.

4.2.5. La vía de p16-Rb señala el fenotipo senescente de las células G.

Existen diversas vías de señalización responsables del fenotipo senescente mediadas por la activación de p53 y Rb, así como por la sobreexpresión de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p21^{cip}, p16^{INK4A} y p27^{kip}, culminando todas ellas en un bloqueo del ciclo celular (revisado en (Bringold y Serrano, 2000)). Con el fin de caracterizar la vía o vías de señalización activada/s en nuestro sistema experimental, analizamos la expresión de los mRNAs de algunas de las proteínas responsables de la señalización de senescencia prematura más representativas. La Figura R29 indica una gran sobreexpresión en células G de los transcritos de p16^{INK4A} y de p21^{cip}, que podría corresponder con la activación de las vías de p16-Rb y p53-p21, ambas implicadas en senescencia (Serrano y cols., 1997; Itahana y cols., 2001; Ohtani y cols., 2004). Los transcritos de otros componentes de estas vías como son CDK4 y Rb en la vía de p16-Rb y de p53 en la vía de p53-p21 están disminuidos en células G (Fig. R29). Asimismo, se observó que la expresión de p27^{kip}, de la vía de senescencia PTEN-p27, resultó significativamente reprimida (Fig. R29). Consistente con estos resultados de inducción de un fenotipo senescente/ no proliferativo en las células G se observa un aumento en la expresión de dos genes marcadores de estrés celular, DDIT3 y GADD45A (Fig. R29).

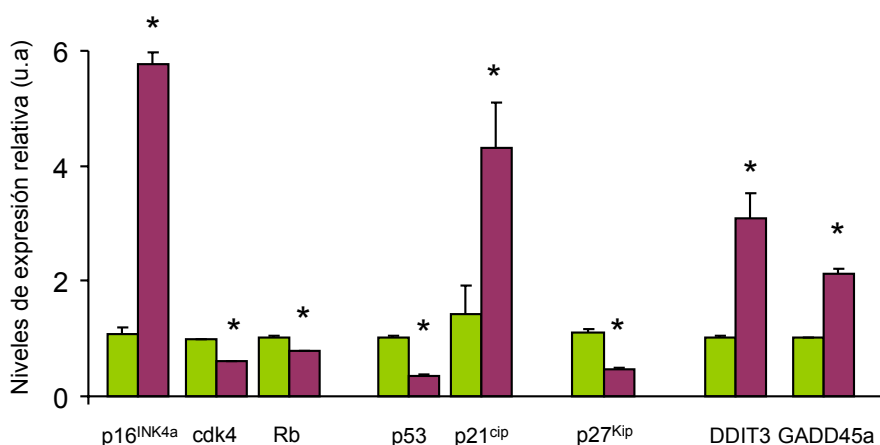


Figura R29. Análisis de la expresión de los genes más comúnmente alterados en las vías de señalización de senescencia prematura y estrés oxidativo. Las células HepG2 se trataron en ausencia (M) o presencia de OL (G) y se emplearon para la extracción de RNA y posterior análisis por RT-PCR. Los niveles de expresión relativa se normalizaron usando el criterio del algoritmo Normfinder respecto a la expresión de los genes PHGDH y NDUFAF determinada también por qPCR. Los histogramas representan la media±SEM de 3 réplicas biológicas para células M (barras en verde) y G (barras en morado). *, $p < 0,001$ al comparar frente a células M.

Con la intención de precisar la vía de senescencia responsable del fenotipo G estudiamos la expresión de las proteínas p53 y su diana preferente, p21^{cip}, en células M y G (Fig. R30a). Aparentemente, el fenotipo senescente observado en células G es independiente de la vía de p53/p21 ya que detectamos menor expresión tanto en la proteína p53 como en p21^{cip}, estando esta última enormemente disminuida en las células G (Fig. R30a). Es importante destacar la gran discrepancia entre la expresión del mRNA y la proteína de p21^{cip} lo que puede sugerir la existencia de un control traduccional muy estricto para esta proteína en condiciones de estrés metabólico.

Sin embargo, y en concordancia con los datos de mRNA (Fig. R29), se aprecia un aumento muy significativo de los niveles de expresión de la proteína p16^{INK4A} en células G (Fig. R30b). Estos resultados sugieren la activación de la vía de p16-Rb. En su estado hipofosforilado, la proteína Rb permanece asociada a factores de transcripción como E2F silenciando así su actividad, y en consecuencia la progresión del ciclo celular (Bringold y Serrano, 2000). Analizamos la expresión de Rb mediante *western blot* y observamos el desdoblamiento de la banda correspondiente a esta proteína en células M (Fig. R30c), lo que podía estar sugiriendo la existencia de variaciones en el estado de fosforilación de la proteína entre los dos tipos celulares. Por este motivo, estudiamos las posibles modificaciones covalentes de esta proteína mediante geles bidimensionales (Fig. R30d). Los resultados muestran diferencias en el estado de fosforilación de Rb entre células M y G (Fig. R30d). En concreto, se aprecia que las dos isoformas mayoritarias de Rb en células M, que tienen pI de 8.0 y de 7.5-6.0, experimentan un desplazamiento hacia pI más básicos en las células G, siendo los pI de las formas mayoritarias en estas células de 8.2 y

7.1 (Fig. R30d), lo que indica una modificación covalente por fosforilación de la proteína. En resumen, los resultados indican que la proteína Rb se encuentra hipofosforilada en las células G, demostrando que es la vía de p16-Rb la que señala el fenotipo senescente y conduce al arresto del ciclo celular observado.

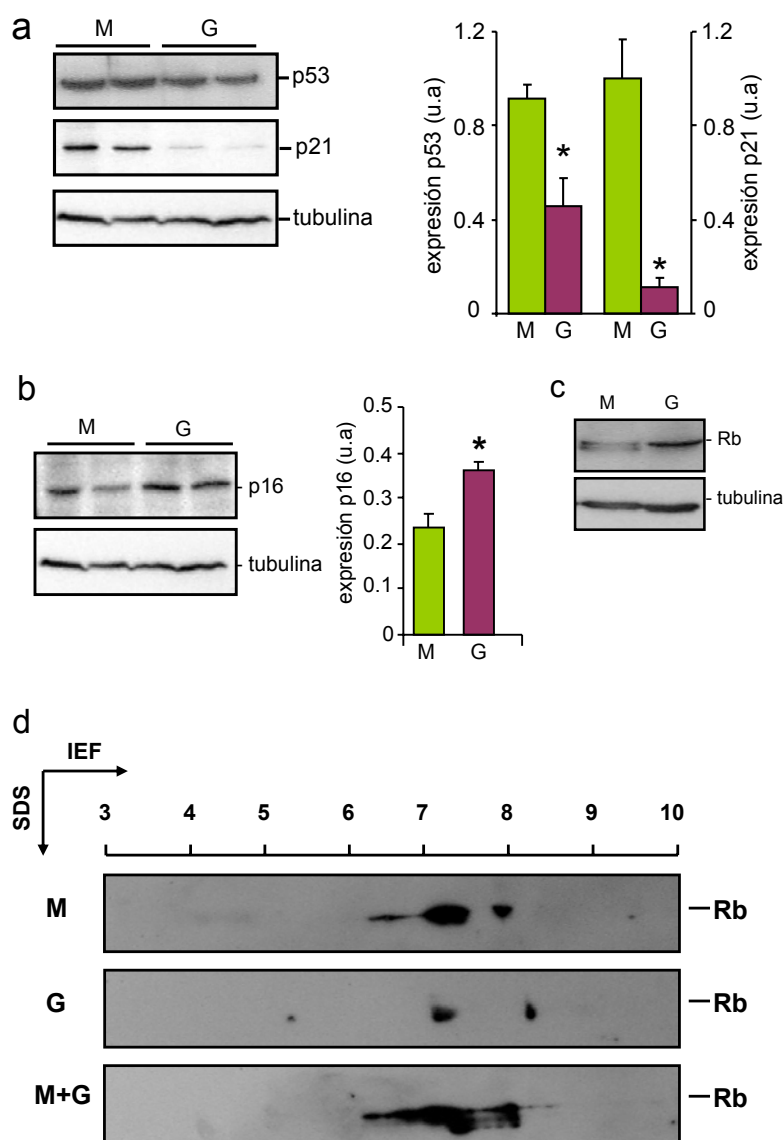


Figura R30. Caracterización de la vía de senescencia activada en células G. Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas p53, p21 (**a**), p16 (**b**), y retinoblastoma (Rb) (**c**) en preparaciones de células tratadas con OL (G) y sin tratamiento (M). La carga de las muestras se verificó mediante la expresión de la proteína α -tubulina. Los histogramas representan la media \pm SEM de la expresión de las proteínas p53, p21(**a**) y p16 (**b**) determinada en dos experimentos independientes. *, $p < 0,05$ al comparar frente a M. (**d**) Análisis bidimensional de la proteína Rb en células M y G. Se realizaron *western blot* de extractos de células M, G y la mezcla de ambos al 50%. En la primera dimensión las proteínas se separaron en función de su punto isoeléctrico (IEF). En la segunda dimensión las proteínas se fraccionaron de acuerdo a su tamaño (SDS). Las membranas se incubaron con el anticuerpo Rb. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

4.2.6. El fenotipo senescente confiere resistencia a la muerte celular por vía mitocondrial.

El análisis de expresión génica (Fig. R21) de las células sugiere que los marcadores de muerte celular estudiados están disminuidos en células G. Por otro lado, la pérdida de la función bioenergética de la mitocondria está íntimamente ligada a la resistencia a estímulos de muerte celular (Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006). El proceso apoptótico está en parte gobernado por la familia de proteínas Bcl-2 que posee tanto miembros pro-apoptóticos como anti-apoptóticos. Estudiamos la expresión de dos proteínas de esta familia, Bax (pro-apoptótica) y Bcl-x_L (anti-apoptótica) mediante técnicas de *western blot*. Detectamos una ligera disminución de la expresión de la proteína Bax en las células G paralela a una inducción de Bcl-x_L (Figura R31a). De este modo, el índice proteómico Bax/Bcl-x_L que permite inferir el potencial apoptótico de la célula, resultó ser significativamente menor en células G que en M (Fig. R31a), lo que apoya su mayor resistencia a muerte. Por este motivo, analizamos en las líneas celulares de HepG2 la respuesta a estaurosporina, un inhibidor de proteína quinasa que induce muerte por la vía mitocondrial (Tamaoki y cols., 1986). En efecto, el tratamiento con estaurosporina induce muerte celular en células M (~50% en 24h) mientras que el mismo tratamiento no tiene efectos significativos sobre las células G (Fig. R31b). La muerte celular inducida por estaurosporina en células HepG2 es independiente de la vía de las caspasas ya que z-vad.fmk, el inhibidor genérico de las mismas, no previene la muerte celular (Fig. R31b). En conjunto, estos resultados indican que la pérdida de función mitocondrial de la célula conduce a un fenotipo de resistencia a muerte celular.

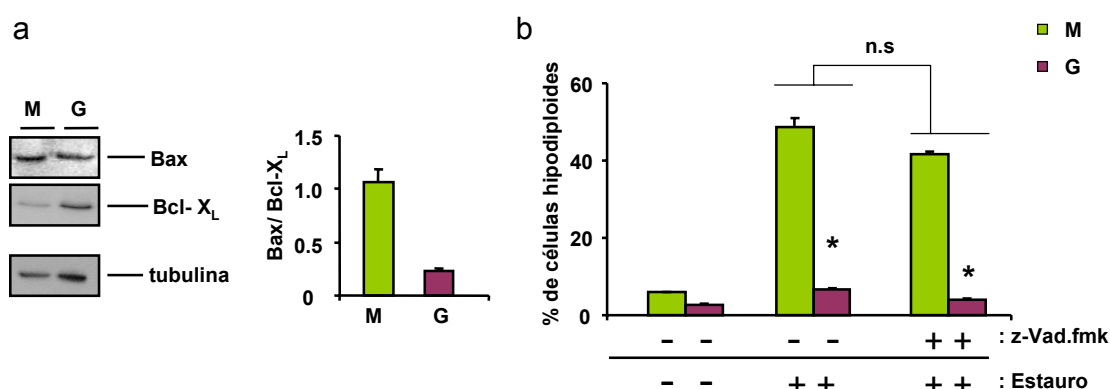


Figura R31. La pérdida de la función bioenergética de la mitocondria en células G está asociada con su resistencia a estímulos de muerte celular. (a) Análisis por *western blot* de la expresión de las proteínas Bax (pro-apoptótica), Bcl-x_L (anti-apoptótica) y tubulina en extractos de células M y G. Los histogramas muestran el potencial apoptótico estimado por la razón Bax/ Bcl-x_L (b) Células tratadas con OL (G) y sin tratamiento (M) se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de z-Vad.fmk 20μM y se trataron o no con estaurosporina 1μM durante 24h para la determinación de la cantidad de células con fragmentación de DNA (picos hipodiploides) mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la media±SEM de 6 experimentos independientes. *, p<0,05 al comparar frente a M. n.s, no significativo al comparar las células tratadas con z-Vad.fmk frente al tratamiento con estaurosporina.

4.3. Marcadores del metabolismo energético en el panel de líneas celulares tumorales del NCI-60 (National Cancer Institute).

En 1980s el Instituto Nacional del Cáncer (USA) seleccionó 60 líneas celulares humanas derivadas de 9 tipos tumorales distintos (mama, sistema nervioso central, colon, células de la sangre, pulmón, melanomas, ovario, próstata y riñón) que definieron el panel NCI-60 de células cancerígenas que se han utilizado como herramienta muy importante para el rastreo de fármacos y terapias en cáncer. Las aproximaciones experimentales realizadas con el NCI-60 engloban desde estudios de caracterización farmacológica de distintos compuestos (Bussey y cols., 2006), cariotipado (Roschke y cols., 2003), análisis de la expresión génica basal (Blower y cols., 2007) y en respuesta a estrés (Efferth y Oesch, 2004), predicción de quimiosensibilidad (Lee y cols., 2007), citotoxicidad (Shoemaker, 2006) o potenciación de fármacos (Dai y cols., 2006). En conjunto, todos estos estudios han aportado evidencias de una respuesta muy heterogénea entre las diferentes líneas celulares. Dada la relevancia del metabolismo energético en cáncer y del valor de la *huella bioenergética* como marcador pronóstico de la enfermedad (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007) y eventual diana terapéutica (Shin y cols., 2005; Santamaria y cols., 2006; Lin y cols., 2008), nos propusimos caracterizar desde el punto de vista de la *huella bioenergética* el panel del NCI-60 para poder así contribuir al diseño de estrategias anti-tumorales. Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. J.C. Reed en el *Burham Institute* de la Jolla, directamente con la Dra. S.Holbeck del NCI y con el grupo del Dr. J. Montoya de la Universidad de Zaragoza.

4.3.1. Análisis del fenotipo bioenergético del panel del NCI-60.

La Tabla R4 resume los datos de la expresión de los marcadores del metabolismo energético, así como de los índices derivados de ellos en el panel NCI-60. El análisis de la expresión de los marcadores se realizó mediante técnicas de *western blot* en las distintas líneas celulares. Para comparar los diferentes geles se incluyó la línea HepG2 en todos ellos y se usó como control interno y valor de normalización de la expresión de cada marcador en las distintas líneas celulares. Los resultados de estos geles están recogidos en el Anexo I (Fig. A1) y depositados en la base datos de *Molecular Targets* del NCI con los números de acceso siguientes: β -F1-ATPasa, MT1339; Hsp60, MT1337; GAPDH, MT1335; mtDNA, MT2817, y Δ Ct, MT2818. En líneas generales no se aprecian grandes diferencias en la *huella bioenergética* entre los distintos tipos celulares analizados. De hecho, el análisis para comparar el patrón de expresión de los marcadores metabólicos mediante el uso del programa EPCLUST (<http://www.bioinf.ebc.ee/EP/EP>) (ver materiales y métodos) en las 60 líneas celulares por el método de agrupación jerárquica pone de manifiesto la ausencia de grupos de células en función del tejido tumoral de procedencia (Fig. R32a).

	β F1	Hsp60	mtDNA	GAPDH	β /Hsp60	β /GAPDH
Mama						
BT549	0,57	0,18	1,25	4,51	3,17	0,13
HS578T	0,59	0,35	0,79	4,26	1,69	0,14
MCF7	0,48	0,06	1,36	5,28	8,00	0,09
ADR-RES	0,33	0,63	3,69	4,65	0,52	0,07
MDA-231	0,20	0,55	0,71	6,33	0,36	0,03
MDA-435	0,20	0,37	0,79	5,02	0,54	0,04
MDA-N	1,33	1,67	N.D	7,56	0,80	0,18
T47D	2,31	1,29	1,31	0,21	1,79	11,04
media	0.53 ± 0.1	0.54 ± 0.2	1.43 ± 0.4	5.37 ± 0.4	2.15 ± 1.0	0.10 ± 0.020
Leucemias/Linfomas						
SR	0,36	1,08	4,09	1,93	0,33	0,19
RPM18226	1,63	1,13	2,15	0,05	1,44	35,05
MOLT4	0,43	0,93	0,26	1,49	0,46	0,29
K562	0,33	0,80	38,81	0,60	0,41	0,55
HL60	0,27	0,17	2,54	0,51	1,59	0,53
CCRF	1,03	1,24	2,95	1,35	0,83	0,76
media	0.48 ± 0.14	0.84 ± 0.18	2.4 ± 0.8	1.18 ± 0.27	0.73 ± 0.23	0.46 ± 0.10
Próstata						
PC3	1,15	0,93	0,33	0,64	1,24	1,80
DU145	1,90	0,12	0,78	1,20	15,83	1,58
media	1.53 ± 0.38	0.53 ± 0.41	0.55 ± 0.23	0.92 ± 0.28	8.53 ± 7.30	1.69 ± 0.11
Colon						
SW620	1,85	1,36	4,77	0,66	1,36	2,80
KM12	0,35	1,01	0,30	1,45	0,35	0,24
HT29	0,85	0,90	0,84	0,86	0,94	0,99
HCC2998	1,25	1,07	6,88	1,08	1,17	1,16
HCT116	1,95	1,35	3,85	0,16	1,44	12,19
HCT15	1,95	1,80	0,20	0,77	1,08	2,53
COLO 205	0,10	0,10	0,47	0,77	1,00	0,13
media	1.06 ± 0.31	1.04 ± 0.23	2.24 ± 1.17	0.93 ± 0.12	0.98 ± 0.14	1.31 ± 0.46
Pulmón						
A549	0,61	0,80	1,11	0,51	0,76	1,20
EKVX	2,15	0,58	0,73	1,32	3,71	1,63
HOP62	0,61	1,35	0,64	1,06	0,45	0,58
HOP92	0,54	0,90	1,06	1,00	0,60	0,54
H322M	0,46	0,13	1,08	1,23	3,54	0,37
H226	0,10	0,31	5,15	0,63	0,32	0,16
H23	0,10	0,15	0,27	0,68	0,67	0,15
NCI522	3,62	0,86	0,62	0,41	4,21	8,83
NCI460	3,69	0,61	2,12	0,34	6,05	10,85
media	0.65 ± 0.26	0.60 ± 0.17	1.43 ± 0.63	0.92 ± 0.12	1.44 ± 0.57	0.66 ± 0.21
Melanoma						
UACC257	1,58	1,36	13,16	1,59	1,16	0,99
UACC62	0,53	0,56	1,13	1,78	0,95	0,30
SKMEL28	0,61	1,05	1,08	1,96	0,58	0,31
SKMEL5	1,16	1,00	8,53	1,41	1,16	0,82
SKMEL2	0,72	1,05	0,91	2,19	0,69	0,33
M14	0,53	0,52	0,48	2,37	1,02	0,22
MALME3M	1,69	1,03	0,94	2,67	1,64	0,63
LOXIMVI	1,11	0,20	1,07	2,59	5,55	0,43
media	0.99 ± 0.16	0.85 ± 0.13	3.41 ± 1.68	2.07 ± 0.16	1.59 ± 0.58	0.50 ± 0.10
Riñón						
UO31	0,50	0,47	5,22	0,50	1,06	1,00
TK10	0,63	0,77	0,89	1,63	0,82	0,39
SN12C	0,88	0,77	0,78	1,69	1,14	0,52
RXF393	0,44	0,88	1,69	1,69	0,50	0,26
Caki-1	0,31	0,98	4,22	2,00	0,32	0,16
ACHN	0,23	0,49	1,79	2,63	0,47	0,09
A498	0,77	0,70	7,20	2,13	1,10	0,36
786-O	0,38	0,74	1,44	1,63	0,51	0,23
media	0.52 ± 0.08	0.73 ± 0.07	3.08 ± 0.94	1.74 ± 0.15	0.74 ± 0.12	0.38 ± 0.04
SNC						
SF539	0,37	0,28	0,75	0,02	1,32	15,91
SF295	1,37	1,25	0,86	0,95	1,10	1,44
SF268	0,50	0,80	1,70	0,77	0,63	0,65
U251	0,11	0,06	1,06	1,96	1,83	0,06
SNB75	0,15	0,05	2,79	1,33	3,00	0,11
SNB19	0,74	1,22	0,98	0,89	0,61	0,83
media	0.57 ± 0.23	0.68 ± 0.27	1.48 ± 0.36	1.18 ± 0.22	1.43 ± 0.45	0.62 ± 0.25
Ovario						
SKOV3	2,19	1,31	2,26	0,37	1,67	5,92
OVCAR8	0,89	1,47	2,76	2,22	0,61	0,40
OVCAR5	0,93	1,71	1,34	1,67	0,54	0,56
OVCAR4	0,56	0,85	4,65	1,67	0,66	0,34
OVCAR3	1,89	1,22	0,33	1,15	1,55	1,64
IGROV1	1,04	1,47	0,78	0,63	0,71	1,65
media	1.06 ± 0.22	1.34 ± 0.14	1.97 ± 0.78	1.47 ± 0.26	0.81 ± 0.18	0.92 ± 0.3

Tabla R4. Datos de expresión de los marcadores del metabolismo energético en el panel del NCI-60. En la tabla se resumen los valores de expresión de las proteínas β -F1-ATPasa, Hsp60, y GAPDH, los índices bioenergéticos β -F1/Hsp60 y β -F1/GAPDH, y los valores del número de copias relativo de mtDNA en las 60 líneas celulares tumorales que componen el panel del NCI-60. Se muestra la media \pm SEM de la expresión de cada uno de los marcadores en cada tejido. Las líneas celulares resaltadas en color no se han incluido en el cálculo de la media del tipo celular por presentar mucha disparidad en la expresión de alguno de estos marcadores

Hay que destacar la existencia de un grupo de líneas celulares que presentan una mayor *huella bioenergética* (β -F1/GAPDH) (# en Fig. R32a). Este agrupamiento responde a casos puntuales de líneas celulares y no a una clasificación específica de tejido. Es decir, la *huella bioenergética* y el contenido de mtDNA indican que las líneas tumorales derivadas de distintos tejidos tienen esencialmente la misma dotación mitocondrial (Fig. R32b), aunque sí debemos destacar que el índice β -F1/GAPDH en las líneas celulares derivadas de carcinoma de mama resultó significativamente menor que en cualquiera de las otras líneas celulares (Fig. R32b).

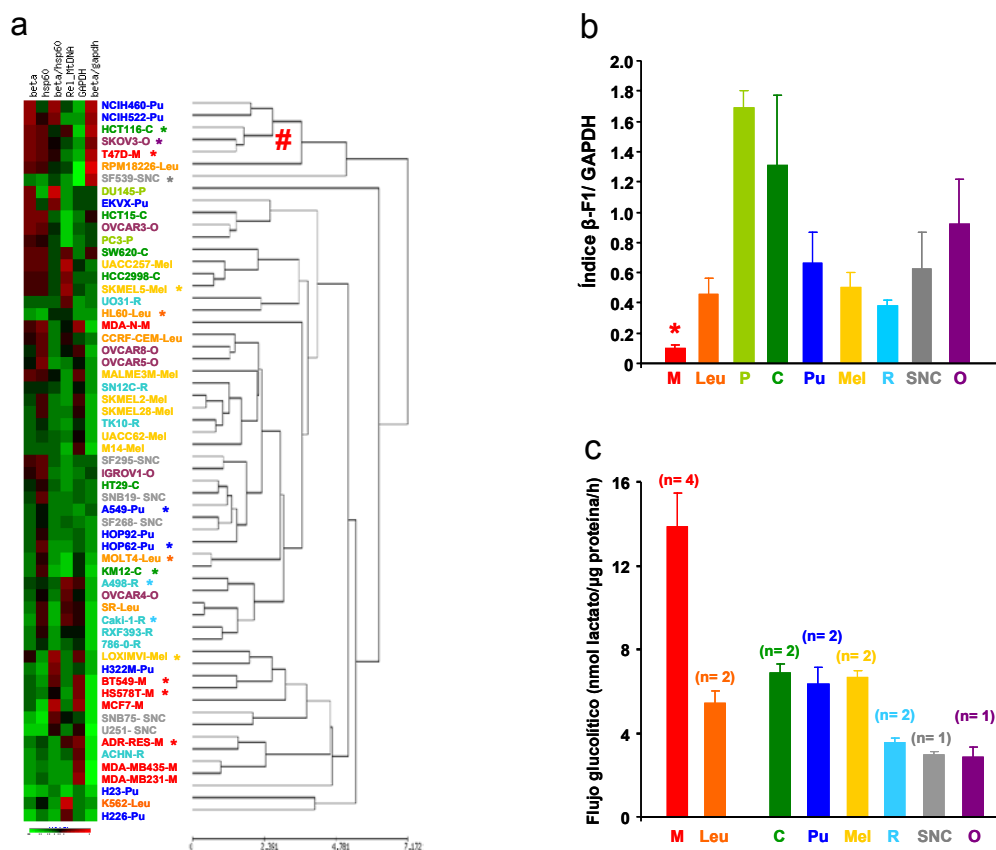


Figura R32. Estudio del fenotipo bioenergético en el panel de células del NCI-60. (a) La cuantificación de los niveles de expresión de los marcadores se realizó por *western blot* y la determinación del número relativo de copias de DNAm por qPCR. La expresión se analizó de forma conjunta mediante el programa EPCLUST en las 60 líneas celulares, para ello la expresión de cada muestra se normalizó respecto a los valores de expresión de cada marcador en la línea celular HepG2. Las células derivadas de 9 tejidos diferentes se representan atendiendo al siguiente criterio de colores: azul oscuro, pulmón (Pu); verde oscuro, colon (C); morado, ovario (O); rojo, mama, M); naranja, leucemias y linfomas (Leu); gris, sistema nervioso central (SNC); verde claro, próstata (P); azul claro, renal (R) y amarillo, melanomas (Mel). La gradación de colores que se representa en la parte inferior está codificada de forma que el rojo y el verde indican un valor de expresión mayor y menor respecto al de referencia, respectivamente. El análisis genera el agrupamiento jerárquico de las líneas celulares por su huella bioenergética que se representa a la derecha en forma de dendrograma. #, indica el grupo de líneas celulares que no han sido incluidas en el cálculo del índice bioenergético medio para cada tipo celular representado en (b). *, indica las líneas celulares representativas de cada tejido que se han utilizado para la determinación de la glucólisis aerobia en (c). Los histogramas en (b) representan la media \pm SEM del índice bioenergético β -F1/GAPDH determinado por *western blot* en las distintas líneas celulares dentro de cada tipo celular. *, $p < 0,05$ al comparar frente al resto de líneas celulares. (c) Determinación del flujo glucolítico mediante la estimación del lactato producido. Los histogramas representan la media \pm SEM de al menos 6 determinaciones independientes en un número representativo de líneas celulares derivadas de cada uno de los tejidos (n).

Con el fin de estimar la actividad metabólica de los distintos tipos celulares seleccionamos algunas de las líneas (~ 25% del panel) para la determinación del flujo glucolítico (Fig. R32c). De forma consistente con su *huella bioenergética* (Fig. R32b) se observa que las células derivadas de carcinoma de mama tienen un flujo glucolítico más alto que cualquiera de los otros tipos celulares (Fig. R32c). Congruentemente con lo que hemos descrito anteriormente, los cambios en la expresión de los marcadores de la *huella bioenergética* están relacionados con cambios en el flujo glucolítico y en la actividad de la fosforilación oxidativa celular (Lopez-Rios y cols., 2007).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. La progresión del cáncer colorrectal requiere la represión de la función bioenergética de la mitocondria.

El número, composición molecular y relevancia funcional de las mitocondrias es muy diferente entre los distintos tejidos de mamíferos (Pagliarini y cols., 2008). Además, se ha descrito que tanto la ultraestructura mitocondrial como su composición molecular varía en función de los sustratos energéticos disponibles para la generación de energía metabólica (Rossignol y cols., 2004). En esta tesis hemos estudiado el papel que desempeña la mitocondria durante el proceso de carcinogénesis en cáncer colorrectal. Con este propósito, hemos generado y caracterizado dos fenotipos celulares a partir de la línea celular HCT116 derivada de carcinoma colorrectal humano que presentan enormes diferencias estructurales, moleculares y funcionales en sus mitocondrias respecto a la línea parental.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran cómo la selección *in vivo* de aquellas células tumorales con una función mitocondrial comprometida en favor de un metabolismo energético altamente dependiente de la glucólisis aerobia, es una condición *sinequanon* para la progresión del cáncer de colon. Asimismo, mostramos que la represión de la biogénesis mitocondrial, y específicamente de la diferenciación bioenergética del orgánulo, es un requisito indispensable para el desarrollo del cáncer y proporciona a las células el fenotipo de resistencia a apoptosis favorable para el crecimiento tumoral. La adquisición de esta característica fenotípica en la célula tumoral es una condición reversible muy posiblemente impuesta por el ambiente ácido e hipóxico que rodea al tumor *in vivo*. Sugerimos por tanto, que el fenotipo glucolítico adquirido por la célula tumoral y la reversibilidad de su naturaleza resultan dianas potencialmente útiles para el diseño de estrategias que ayuden a combatir el cáncer colorrectal.

A comienzos del siglo pasado, el científico alemán Otto Warburg sugirió que la alteración del fenotipo bioenergético era una característica propia de la célula tumoral y el resultado del daño irreversible de la respiración mitocondrial (Warburg, 1956a). Sin embargo, el metabolismo energético de los tumores no ha sido objeto de estudio en la investigación oncológica hasta hace pocos años. Muchos estudios se han centrado en la identificación de posibles marcadores moleculares del cáncer que puedan contribuir en la detección, pronóstico y progresión de la enfermedad. En este sentido, están emergiendo toda una serie de aproximaciones genómicas (Petricoin y cols., 2002; Ramaswamy y Golub, 2002) y proteómicas (Wulfkühle y cols., 2003) que están favoreciendo la identificación de los genes y proteínas que definen la firma de los distintos tipos de cáncer (Liotta y Kohn, 2003; Ramaswamy y cols., 2003).

Nuestro laboratorio ha contribuido en este aspecto mediante la definición de una aproximación proteómica basada en el estudio de los índices β -F1/Hsp60 y BEC (índice

bioenergético celular) que representan la *huella bioenergética del cáncer*, y que nos han permitido demostrar la existencia de una profunda alteración en el proteoma mitocondrial de tumores humanos de hígado, mama, pulmón, colon, riñón y estómago (Isidoro y cols., 2004). Asimismo, hemos puesto de manifiesto la relevancia clínica de esta herramienta como marcador para el diagnóstico de adenocarcinomas de pulmón (Cuezva y cols., 2004) y de mama (Isidoro y cols., 2005), y pronóstico en carcinoma de colon (Cuezva y cols., 2002), mama (Isidoro y cols., 2005) y pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007), así como en la adquisición del fenotipo maligno invasivo en melanomas (Govindarajan y cols., 2007). En esta tesis ilustramos cómo células derivadas de carcinoma colorrectal tratadas con OL (células G) o 2-DG (células SM), inhibidores de la fosforilación oxidativa y glucólisis respectivamente, inducen cambios en la expresión de la subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa, β -F1-ATPasa. Los cambios en la expresión celular de esta proteína se traducen en la disminución en células G y aumento en células SM de la huella mitocondrial estimada por los índices bioenergéticos β -F1/Hsp60 y β -F1/GAPDH, definiendo en último término, el fenotipo celular exitoso para la progresión del cáncer.

Diversos estudios han descrito que la H^+ -ATP sintasa juega un papel fundamental en la organización y correcto plegamiento de la membrana mitocondrial interna en levaduras (Paumard y cols., 2002; Goyon y cols., 2008; Strauss y cols., 2008) y en células de mamífero (Giraud y cols., 2002; Minauro-Sanmiguel y cols., 2005). Por otro lado, la actividad de la fosforilación oxidativa global en las células depende tanto de la competencia bioenergética de las mitocondrias como de su representación en la célula, siendo ambas características específicas de cada tipo celular (Cuezva y cols., 1997). En adenocarcinomas de colon (Cuezva y cols., 2002), riñón, estómago y otros tejidos (Isidoro y cols., 2004) se produce una represión selectiva de la expresión de la proteína β -F1-ATPasa, mientras que en hepatocarcinomas se observa una represión general de componentes de la biogénesis mitocondrial (de Heredia y cols., 2000), lo cual ejemplifica dos vías alternativas por las que la función mitocondrial puede resultar alterada en cáncer. En los dos modelos celulares derivados de la línea HCT116 (G y SM) los cambios observados en la expresión de β -F1-ATPasa podrían resultar de variaciones en el contenido de mitocondrias por célula y/o por alteraciones en el grado de diferenciación bioenergética del orgánulo. Sin embargo, la ausencia de variaciones en los niveles de expresión de la proteína estructural de la mitocondria Hsp60, y en el número de orgánulos por célula, así como los profundos cambios ultraestructurales observados en función de los niveles de expresión de β -F1-ATPasa, sugieren que los tratamientos afectan específicamente la diferenciación funcional de las mitocondrias.

El estudio de la expresión de los genes de la fosforilación oxidativa durante el desarrollo del hígado de rata permitió a nuestro grupo identificar un paradigma de biogénesis mitocondrial regulado por el control traduccional de mRNAs necesarios para la función de la mitocondria (Cuezva y cols., 1997). Paradójicamente, en el hígado fetal el

número de mitocondrias es menor que en el hígado adulto, y sin embargo se aprecia que el contenido relativo celular de transcritos de la fosforilación oxidativa es mucho mayor (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995b). De forma específica, la actividad transcripcional del gen nuclear β -F1-ATPasa aumenta a medida que se produce el desarrollo del hígado, siendo su actividad máxima en el estadio adulto (Izquierdo y cols., 1995b). Esta aparente contradicción se debe a que existen mecanismos regulados en desarrollo que controlan la estabilidad y eficiencia traduccional de β -F1-ATPasa (Cuezva y cols., 1997). Así, se ha demostrado que el mensajero nuclear que codifica esta proteína sufre un proceso de enmascaramiento traduccional en el hígado fetal que desaparece inmediatamente después del nacimiento cuando se activa su traducción para la síntesis efectiva de mitocondrias en el hepatocito (Valcarce y cols., 1988; Luis y cols., 1993; Izquierdo y Cuezva, 1997). Asimismo, se ha descrito que el fenotipo mitocondrial observado en hepatomas podría ser el resultado de una desdiferenciación de la célula tumoral a un programa de expresión de genes de la fosforilación oxidativa similar al que se observa en el hígado fetal (Cuezva y cols., 1997). En el contexto de esta tesis, el fenotipo mitocondrial observado en células G recuerda enormemente al observado en el hepatocito fetal, sugiriendo la desdiferenciación de las mitocondrias como resultado de la represión de la expresión de β -F1-ATPasa. La naturaleza reversible de los cambios en el fenotipo bioenergético de la mitocondria que hemos descrito en el modelo de carcinoma colorrectal (HCT116) refleja la respuesta que se produce en las mitocondrias en función de la disponibilidad de sustratos energéticos (Rossignol y cols., 2004), sugiriendo la posible implicación de la vía de señalización de AMP quinasa (AMPK) en la definición del fenotipo mitocondrial celular (Canto y cols., 2009). En este sentido, una hipótesis que resulta atractiva es que el fenotipo mitocondrial puede estar regulado a corto plazo por sensores moleculares que definen el estado energético celular promoviendo así la desdiferenciación del orgánulo (células G), o la diferenciación funcional del mismo (células SM). Se ha descrito que la inhibición de la traducción de β -F1-ATPasa en el hígado fetal (Izquierdo y Cuezva, 1997) y en el proceso de oncogénesis (de Heredia y cols., 2000) se debe a la unión de proteínas represoras al extremo 3' del mensajero. Estas proteínas enmascaran su traducción y favorecen su estabilización y representatividad celular simultáneamente con la menor producción de la proteína. Presumiblemente, estas interacciones responden a cambios en el entorno celular con el fin de permitir la adaptación de la célula a una nueva situación fisiológica o patológica. El estado redox de la célula y/o la disponibilidad de nucleótidos de adenina modulan el diferente grado de unión de estas proteínas (Izquierdo y Cuezva, 2005), pudiendo regular el metabolismo del mRNA en la situación particular que nos ocupa.

Los cambios moleculares, estructurales y funcionales producidos en las mitocondrias por los tratamientos, también se manifiestan en la actividad de las vías metabólicas que controlan el flujo de energía en la célula tumoral. En este sentido, hemos aportado la primera evidencia en células de mamífero de la asociación inversa que existe entre la actividad de

la fosforilación oxidativa y la tasa de glucolisis aerobia. Recientemente hemos descrito que el índice bioenergético que estima la capacidad mitocondrial global de la célula (β -F1/GAPDH) está inversamente asociado *in vivo* con la captación de glucosa en carcinomas de pulmón estimada por tomografía de emisión de positrones (FDG-PET), así como con la utilización aeróbica de la glucosa en células de carcinoma colorrectal humano (Lopez-Rios y cols., 2007). Estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de la actividad bioenergética de la mitocondria en la definición del consumo y utilización de glucosa en células y tumores, apoyando de este modo la importancia del Efecto Pasteur en la biología del cáncer (revisado en (Warburg, 1966)).

Los mecanismos moleculares que subyacen al crecimiento tumoral durante el proceso de carcinogénesis todavía no han sido esclarecidos. Son muchos los estudios que han hecho especial hincapié en el análisis de los perfiles de expresión génica de células cancerígenas y tumores con objeto de descifrar los eventos moleculares que conducen al crecimiento y progresión de las distintas neoplasias (Ma y cols., 2003; Hoek y cols., 2004; Yao y cols., 2006; Hu y cols., 2008). En este aspecto, los resultados descritos en esta tesis ilustran que la adquisición del fenotipo agresivo (células G) en cáncer de colon se acompaña de alteraciones en la expresión de genes implicados en angiogénesis, desarrollo vascular, proliferación celular, apoptosis, adhesión celular y dinámica del citoesqueleto. Es importante resaltar que las células G muestran una inducción muy significativa en la expresión de lipocalina 2, un gen que juega un papel crucial en la invasión celular en cáncer de mama (Yang y cols., 2009). Nuestros resultados también ponen de manifiesto la activación en células G de rutas de degradación de proteínas, metabolismo de RNA así como la activación de la ruta de las pentosas fosfato. Esta última es la vía responsable de la generación del NADPH celular necesario para procesos biosintéticos, especialmente para la síntesis de ácidos grasos, y ha sido descrita como una de las actividades biosintéticas que se inducen en las células tumorales (Hatzivassiliou y cols., 2005; Ramos-Montoya y cols., 2006), aunque su papel en la proliferación de células transformadas se ha puesto en duda recientemente (Funes y cols., 2007). Además de la regulación diferencial en las rutas mencionadas entre los dos fenotipos celulares estudiados, debemos resaltar un aspecto muy relevante que acompaña al proceso de tumorigénesis: la represión de genes implicados en funciones mitocondriales. Así, en las células G se observa una represión en la expresión de genes responsables de la oxidación del piruvato y aminoácidos, del funcionamiento del ciclo de Krebs, de la actividad de la fosforilación oxidativa y de la biogénesis mitocondrial. Estos hallazgos son coherentes con los datos moleculares, funcionales y ultraestructurales obtenidos en células G, y proporcionan la primera evidencia que vincula la progresión tumoral *in vivo* con la inevitable adquisición de un fenotipo de represión mitocondrial. Recientemente, se ha observado que células tumorales que crecen *in vivo* presentan un perfil de expresión de genes glucolíticos y del TCA muy diferente respecto a células transformadas *in vitro* (Funes y cols., 2007).

La selección del fenotipo G altamente glucolítico, podría responder inicialmente a la mayor demanda de la célula tumoral de esqueletos carbonados necesarios para la división celular y por tanto, para el crecimiento del tumor. Sin embargo, esta posibilidad no parece factible puesto que, a pesar de mostrar enormes diferencias en el consumo aeróbico de glucosa, los tres fenotipos celulares descritos (SM, M y G) no presentan distintos ritmos de proliferación *in vitro*. La ventaja adaptativa que le confiere a la célula tumoral la adquisición de un fenotipo glucolítico es todavía objeto de debate. Las células proliferativas son esencialmente glucolíticas (Wang y cols., 1976; Brand y Hermfisse, 1997) y durante las fases S, G2 y M del ciclo celular (fases reductivas del ciclo metabólico) la glucólisis es la vía más activa y cuando se sintetizan los componentes moleculares de la mitocondria (Martinez-Diez y cols., 2006; Reinke y Gatfield, 2006). A pesar de que la glucólisis es una vía de producción de energía que resulta mucho menos eficiente que la fosforilación oxidativa, recientemente se ha sugerido que la dependencia glucolítica que se observa en las células tumorales proporciona suficiente energía para satisfacer las demandas celulares (Plas y Thompson, 2005), y que la acidificación del entorno que se produce como consecuencia de la elevada producción de lactato, puede conferir una ventaja proliferativa para las células cancerígenas (Fang y cols., 2008). Asimismo, las condiciones hipóxicas características del entorno tumoral precisan de la activación de una vía de obtención de energía que sea eficiente en ausencia de oxígeno (Fang y cols., 2008). Por otro lado, se ha sugerido que la selección del fenotipo glucolítico *in vivo* confiere resistencia a muerte celular (Michelakis y cols., 2008), ya que el metabolismo energético y la ejecución de la muerte celular son dos actividades mitocondriales que se encuentran molecular y funcionalmente integradas (Matsuyama y cols., 1998; Gross y cols., 2000; Harris y cols., 2000; Shchepina y cols., 2002; Santamaria y cols., 2006). Los resultados descritos en esta tesis sugieren la sobreexpresión de genes relacionados con hipoxia así como la disminución en las células G de la expresión de genes relacionados con la ejecución del programa de muerte celular.

En este contexto surge de forma inevitable la cuestión de ¿por qué la célula tumoral reprime la función bioenergética de sus mitocondrias? Estudios recientes han documentado la predisposición al desarrollo tumoral en modelos de interferencia de la oxidación del piruvato (Thierbach y cols., 2005), mientras que la activación de la función mitocondrial (Hervouet y cols., 2005; Schulz y cols., 2006; Bonnet y cols., 2007; McFate y cols., 2008) o la supresión del metabolismo glucolítico (Fantin y cols., 2006) compromete la capacidad proliferativa de las células tumorales. En definitiva, estos hallazgos apoyan que la actividad mitocondrial en la célula actúa como supresor tumoral (Cuezva y cols., 2009; Jones y Thompson, 2009). Por otro lado, la ejecución de la muerte celular requiere una fosforilación oxidativa eficiente (Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004). Se ha descrito en modelos de levadura que la actividad de la fosforilación oxidativa es necesaria para la toxicidad inducida por Bax (Harris y cols., 2000), y el cribado genético permitió identificar al complejo de la H^+ -ATPasa de la mitocondria como elemento indispensable para la muerte

mediada por Bax (Matsuyama y cols., 1998) y, específicamente, a la subunidad catalítica β -F1-ATPasa (Gross y cols., 2000). Nuestro grupo ha propuesto el posible mecanismo de participación de la H^+ -ATPasa en la ejecución de muerte celular en células de mamífero (Santamaria y cols., 2006). Así, la actividad de la H^+ -ATPasa podría actuar controlando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por tanto, el daño mitocondrial y la ejecución de la muerte celular (Santamaria y cols., 2006). Los resultados presentados en esta tesis sugieren que el fenotipo resistente a muerte observado en las células G en respuesta al 5-FU puede ser el resultado de una menor señalización de ROS, coherente con el papel protector del metabolismo glucolítico en células cancerígenas descrito recientemente (Vaughn y Deshmukh, 2008). En definitiva, la condición metabólica glucolítica imperante en células G disminuye el potencial de ROS modificando así negativamente el umbral para la inducción de muerte celular.

Muchos autores han descrito que la activación/disfunción de oncogenes/genes supresores de tumor promueve cambios metabólicos en la célula tumoral y justifica el efecto Warburg en cáncer (Osthus y cols., 2000; Rathmell y cols., 2003; Elstrom y cols., 2004; Bensaad y cols., 2006; Kim y Dang, 2006; Schieke y cols., 2006). Sin embargo, resultados de nuestro grupo han demostrado que durante el proceso de tumorigénesis se produce un cambio en el fenotipo energético celular que es independiente del oncogén que haya sido activado (Govindarajan y cols., 2005). Por otro lado, se ha descrito que la transformación de células madre mesenquimáticas va asociada a la adquisición de un fenotipo altamente glucolítico y reversible *in vivo* (Funes y cols., 2007). En este sentido, resulta muy importante destacar que la adquisición del fenotipo tumoral observado en células G se produce independientemente de alteraciones en los genes clásicos del cáncer, ya que se trata de un fenotipo reversible inducido por los tratamientos que promueven la represión (G) o activación (SM) del metabolismo mitocondrial, y la consiguiente activación (G) o represión (SM) del metabolismo glucolítico. Sin embargo, la naturaleza reversible de este fenotipo, así como los mecanismos que puntualmente hacen que se convierta en una característica permanente de la transformación neoplásica (Warburg, 1930), todavía deben ser estudiados en profundidad.

La biogénesis mitocondrial se regula de forma específica en cada tipo celular y en respuesta a señales fisiológicas que median termogénesis, proliferación celular y gluconeogénesis. En consecuencia, son muchas las vías de señalización que se han relacionado con este proceso (Spiegelman, 2007; Scarpulla, 2008). La actividad de los factores de transcripción implicados en la regulación de la biogénesis mitocondrial es dependiente de los niveles de Ca^{2+} y del estado energético de las células (Wu y cols., 2002). De hecho, el control de la expresión de genes respiratorios está mediado por proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} como CAMK (Ca^{2+} /calmodulina dependiente) y PKC (Freyssenet y cols., 1999). En las vías que gobiernan la biogénesis y función mitocondrial participan los activadores transcripcionales NRF-1 (Evans y Scarpulla, 1990), NRF-2

(Virbasius y cols., 1993), Sp1, YY1 y CREB entre otros, y los co-activadores nucleares PGC-1 α (Puigserver y cols., 1999), PGC-1 β y PRC-1 (Scarpulla, 2008). La actividad de estas moléculas dirige la síntesis de proteínas mitocondriales y factores de transcripción (TFAM, mtTFBs) y terminación (mTERF) del mtDNA, permitiendo la expresión coordinada del genoma mitocondrial y correcta formación de la masa mitocondrial durante la biogénesis del orgánulo (Scarpulla, 2008). Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica no mostraron cambios relevantes en la expresión de los genes NRF-1 y PGC-1 α (Partek I suministrado en soporte digital) entre los fenotipos celulares M y G. Sin embargo, los activadores transcripcionales NRF-2 y CREB, así como los genes mitocondriales TFAM, TFB2A y mTERF resultaron significativamente reprimidos en las células G (Partek I suministrado en soporte digital y Figuras R9 y R10). Recientemente, se ha descrito que el factor de transcripción Twist-1 interacciona con PGC-1 α y suprime el metabolismo mitocondrial (Pan y cols., 2009), sin embargo, no observamos cambios en su expresión entre los fenotipos celulares M y G (Partek I suministrado en soporte digital).

Las vías de señalización que controlan la represión del programa de biogénesis no están claras. Los resultados obtenidos en esta tesis podrían sugerir la participación combinada de ciertos factores de transcripción que impiden la correcta biogénesis del orgánulo en células G (Fig. D1). Estudios recientes han atribuido al factor de transcripción c/EBP un papel crucial en la biogénesis mitocondrial en tejido adiposo (Carmona y cols., 2002; Chiu y cols., 2004). En este sentido, el gen DDIT3 (CHOP), que inhibe la actividad del factor de transcripción c/EBP en respuesta a estrés mitocondrial (Carriere y cols., 2004) está sobreexpresado en las células G (Partek I suministrado en soporte digital y Fig. R10), por lo que presumiblemente DDIT3 estaría ejerciendo un efecto de represión de la biogénesis del orgánulo a través de la inhibición de c/EBP (Fig. D1). La inducción de CHOP ha sido descrita por otros autores en respuesta a estrés mitocondrial (Zhao y cols., 2002), y en esta situación media la activación de la serina/treonina quinasa TRIB3 (Ishikawa y cols., 2009), cuya expresión también ha resultado significativamente inducida en las células G (Partek I suministrado en soporte digital). Por otro lado, se ha descrito que la estimulación eléctrica de cardiomiocitos produce la activación secuencial de la expresión de Fos, Jun (ambos componentes moleculares del complejo AP-1) y NRF-1, promoviendo la proliferación y diferenciación de la mitocondria (Xia y cols., 1997). La represión de los genes Fos y Jun observada en las células G (Fig. R10 y Partek I suministrado en soporte digital) sugiere la posible participación de estos genes en la represión de la biogénesis del orgánulo (Fig. D1). De acuerdo con otros autores (Kiss-Toth y cols., 2004), la disminución en la expresión de Fos, y por tanto en la actividad transcripcional del complejo AP-1, podría estar favorecida por la sobreexpresión de TRIB3 observada en células G (Fig. D1). Recientemente, la pérdida de función del factor de transcripción Oct-1 se ha relacionado con el cambio metabólico que subyace al proceso de tumorigénesis (Shakya y cols., 2009). Estos hallazgos podrían sugerir la participación de Oct-1 en la adquisición del fenotipo tumoral en cáncer de colon,

sin embargo los datos obtenidos en esta tesis no revelan cambios en la expresión de Oct-1 entre los fenotipos celulares M y G (Partek I suministrado en soporte digital).

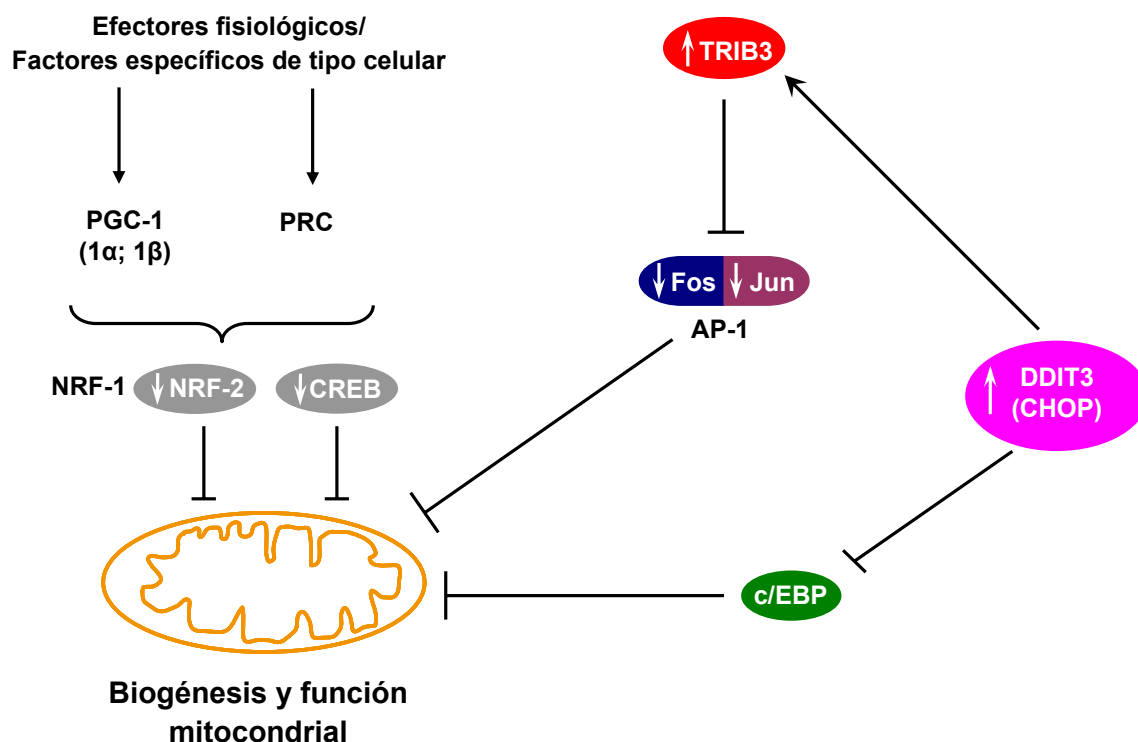


Figura D1. Factores de transcripción que coordinan la represión de la biogénesis mitocondrial en células G. La biogénesis de la mitocondria se regula en respuesta a distintas señales fisiológicas y es específica de cada tipo celular. La represión de los activadores transcripcionales NRF-2 y CREB impide la correcta biogénesis de los componentes de la mitocondria. Por otro lado, el aumento en los niveles de expresión del factor de transcripción DDIT3 (CHOP) bloquea la actividad transcripcional de c/EBP y activa la proteína quinasa TRIB3. La sobreexpresión de TRIB3 inhibe la actividad del complejo AP-1 (Fos/Jun) y contribuye a la represión de la biogénesis del orgánulo en células G.

Puesto que el fenotipo metabólico de la célula tumoral es un marcador del proceso de transformación celular, el uso del metabolismo energético de la célula cancerígena supone una diana terapéutica de gran utilidad para el tratamiento de la enfermedad. Recientemente, nuestro grupo ha implementado un método de cuantificación de los marcadores de la *huella bioenergética* que ha demostrado la similitud del metabolismo energético en diferentes tipos de neoplasias (Acebo y cols., 2009). En este contexto, muchos estudios se han centrado en el descubrimiento y evaluación preclínica de moléculas que puedan interferir con las vías metabólicas activas en las células tumorales (Board y cols., 1995; Mohanti y cols., 1996; De Lena y cols., 2001; Geschwind y cols., 2002; Fahim y cols., 2003; Munoz-Pinedo y

cols., 2003; Ko y cols., 2004; Bonnet y cols., 2007; Kim y cols., 2007b; Hernlund y cols., 2008). Los resultados que se presentan en esta tesis parecen sugerir que los tratamientos no convencionales que actúan inhibiendo la glucólisis (3-BrP y IAA) o activando el metabolismo oxidativo del piruvato en la mitocondria (DCA) en cáncer de colon, resultan tan eficaces en la regresión del tumor como el tratamiento con un agente quimioterapéutico clásico como es el 5-FU, apoyando así los estudios realizados por otros autores (Geschwind y cols., 2002; Fahim y cols., 2003; Ko y cols., 2004; Bonnet y cols., 2007; Kim y cols., 2007b; Wong y cols., 2008).

En este sentido, se ha descrito que la actividad bioenergética celular, estimada por la expresión de la proteína β -F1-ATPasa, está directamente asociada con la susceptibilidad celular a apoptosis en respuesta al 5-FU en cáncer de colon (Shin y cols., 2005; Lin y cols., 2008). Nuestros resultados apoyan estos hallazgos y confirman que la susceptibilidad a muerte por 5-FU está vinculada a la producción de especies reactivas de oxígeno, a pesar de que exista controversia sobre la implicación de los ROS en la señalización de la muerte mediada por la fosforilación oxidativa (Tomiya y cols., 2006). Por otro lado, la glucólisis también está integrada con la apoptosis (Plas y Thompson, 2002; Danial y cols., 2003; Azoulay-Zohar y cols., 2004; Vahsen y cols., 2004; Pospisilik y cols., 2007). De forma consistente con resultados anteriores de nuestro grupo (Santamaria y cols., 2006), hemos demostrado que las células con mayor dependencia de la glucólisis (G) poseen un fenotipo resistente a apoptosis en respuesta al 5-FU, y presumiblemente a otros agentes quimioterapéuticos. Esto supone que las células con mayor dependencia glucolítica son capaces de evadir apoptosis constituyendo un obstáculo en el tratamiento del cáncer (Kasibhatla y Tseng, 2003; Diehn, 2009 #3255). Sin embargo, nuestros resultados ilustran que el metabolismo energético representa la herramienta clave para vencer estos obstáculos, ya que los agentes alquilantes (3-BrP y IAA) que interfieren con la actividad glucolítica celular promueven una muerte masiva de tipo necrótica que contribuye a la regresión del tumor *in vivo*. Además, esta respuesta es gradual y menor en aquellos fenotipos celulares con menor dependencia de la glucólisis (M y SM), lo cual podría explicar la especificidad de estos agentes que promueven necrosis mediada por la activación de PARP1 y la consiguiente depleción de las reservas de NAD^+ citosólico celular (Zong y cols., 2004).

De acuerdo con lo descrito por otros autores (Bonnet y cols., 2007; Wong y cols., 2008), el DCA produce una regresión del tamaño tumoral *in vivo* similar a la observada con los otros tratamientos. Sin embargo, y en contra de estudios en cáncer de pulmón (Bonnet y cols., 2007), próstata (Cao y cols., 2008) y endometrio (Wong y cols., 2008), observamos una muerte apoptótica marginal en células de carcinoma colorrectal en respuesta al DCA. En este sentido, proponemos que la regresión tumoral inducida por el DCA debe responder a un efecto sinérgico entre el arresto de la proliferación celular y la inducción de algún mecanismo de muerte celular (apoptosis o necrosis) que se expresa únicamente en el sistema *in vivo* (Fang y cols., 2008; McFate y cols., 2008). Sugerimos que el tratamiento

con DCA al promover el cambio metabólico en la célula tumoral restaurando la función bioenergética de la mitocondria permite a ésta una señalización efectiva por ROS que impide el crecimiento del tumor por inducción de muerte de las células tumorales en ese ambiente, apoyando resultados de otros investigadores (Bonnet y cols., 2007). En definitiva, estos hallazgos apoyan que la instauración en la célula tumoral de un fenotipo mitocondrial (M y SM) resulta incompatible con la capacidad de esas células para desarrollar tumores.

5.2. La disfunción de la mitocondria induce un fenotipo de senescencia prematura en células HepG2.

Los resultados presentados en esta tesis en células HepG2, muestran que el tratamiento con OL (G) induce una alteración de la composición molecular de la mitocondria que se manifiesta por la pérdida de expresión de subunidades de la fosforilación oxidativa y metabolismo del piruvato, y se expresa a nivel funcional y estructural, por una drástica disminución del consumo de oxígeno y del potencial de membrana mitocondrial y una pérdida de la ultraestructura del orgánulo, respectivamente, muy en consonancia con los datos obtenidos en células HCT116. Así, la disminución de la expresión de la proteína β -F1-ATPasa también se traduce en la reducción de los índices bioenergéticos celulares como consecuencia de la represión de la biogénesis mitocondrial. Contrariamente a lo observado en células HCT116, donde el β -F1mRNA no varía entre células M y G (datos no mostrados), en el caso de células HepG2 sí se aprecia que la disminución de la proteína β -F1-ATPasa es pareja a la disminución del nivel de expresión del mRNA, lo que puede sugerir mecanismos de regulación distintos para esta proteína entre ambos tipos celulares.

En 1995 Allen y cols. propusieron que la dimerización de la H^+ -ATP sintasa dirige el correcto plegamiento de la membrana mitocondrial interna en levaduras. Desde entonces, han sido muchos los estudios que han descrito la participación de la H^+ -ATP sintasa, concretamente de las subunidades e y g, en la dimerización y formación de crestas mitocondriales en levaduras (Paumard y cols., 2002; Goyon y cols., 2008; Strauss y cols., 2008), y en células de mamífero (Giraud y cols., 2002; Minauro-Sanmiguel y cols., 2005). Se ha podido demostrar que la ausencia de estas subunidades favorece la aparición de mitocondrias con crestas aberrantes que se conocen en la literatura como mitocondrias de “tipo cebolla” (Giraud y cols., 2002; Paumard y cols., 2002; Arselin y cols., 2004). Nuestros resultados en células HepG2 demuestran que la menor expresión de la H^+ -ATPasa (células G) va acompañada de la ausencia de dímeros, alteraciones morfológicas en las crestas mitocondriales y la aparición de orgánulos de “tipo cebolla”, confirmando la relevancia de la expresión de la H^+ -ATP sintasa en la ultraestructura mitocondrial. Se ha descrito que el inhibidor fisiológico del complejo V, IF1, está sobreexpresado en distintos tipos de tumores para inhibir la actividad ATP sintasa del complejo (Luciakova y Kuzela, 1984; Bravo y cols., 2004). Recientemente, se ha propuesto que la sobreexpresión de IF1 regula

la dimerización y estructura de la mitocondria en mamíferos (Campanella y cols., 2008). Sin embargo, nuestros resultados tanto en células HCT116 como HepG2, demuestran que es la pérdida de expresión de β -F1-ATPasa lo que promueve la aparición de estructuras mitocondriales aberrantes ya sea por la ausencia de dimerización de la H^+ -ATPasa y/o por otro motivo. De hecho, las células G con mitocondrias de “tipo cebolla” muestran un aumento significativo en la expresión relativa de la proteína IF1, cuestionado así el papel de este regulador en la estructura de la membrana interna de la mitocondria.

La generación de especies reactivas de oxígeno es un proceso fisiológico que depende de la actividad respiratoria celular y determina la longevidad de células y organismos (Hamilton y cols., 2005). El efecto nocivo de los radicales de oxígeno sobre los componentes celulares y su relación con el proceso de envejecimiento fue observado por Harman hace ya más de 50 años (Harman, 1956). Dada la relevancia de las mitocondrias en la generación de especies reactivas de oxígeno, diversos estudios han puesto de manifiesto en levaduras (Aguilaniu y cols., 2003), modelos celulares (Blander y cols., 2003; Macip y cols., 2003; Serra y cols., 2003) y animales (Trifunovic y cols., 2004), que el metabolismo mitocondrial y la senescencia son procesos que están molecular y funcionalmente integrados. Los resultados que se muestran en esta tesis sugieren que la disfunción mitocondrial inducida por el tratamiento con OL, promueve una pérdida de la capacidad proliferativa asociada con manifestaciones típicas de un fenotipo senescente como son la adquisición de morfología alargada y vacuolizada, arresto de las células en G1, tinción positiva a β -galactosidasa y aumento del estrés oxidativo celular.

Estudios recientes en *S. cerevisiae* han demostrado que la disfunción mitocondrial estimula la activación de la respuesta retrógrada durante el proceso de senescencia replicativa. De este modo, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial activa la señalización dependiente de Ca^{2+} y promueve la biogénesis mitocondrial en levaduras (Nautiyal y cols., 2002; Jazwinski, 2005). Estudios similares en células humanas han descrito que esta respuesta puede ser activada por depleción del mtDNA (Miceli y Jazwinski, 2005) y en condiciones de estrés mitocondrial (Biswas y cols., 1999; Amuthan y cols., 2002), aunque para algunos autores no está clara la implicación de la respuesta retrógrada en el proceso de senescencia replicativa (Passos y von Zglinicki, 2005). Por otro lado, un estudio reciente en fibroblastos humanos ha demostrado que el desacoplamiento de la mitocondria que reduce la producción de superóxido retrasa el acortamiento de los telómeros de forma tipo celular específica, poniendo así de manifiesto la relevancia de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales en el proceso de senescencia replicativa (Passos y cols., 2007). Este tipo de senescencia suele estar asociada con la activación de p53 y de p21^{cip} (Stein y cols., 1999; Dulic y cols., 2000; Itahana y cols., 2001). En nuestro estudio, la disfunción mitocondrial inducida por el tratamiento con OL produce un aumento en la producción de ROS, sin embargo por su curso temporal y la ausencia de activación de la vía de señalización de p53-p21^{cip}, el fenotipo senescente observado en células G no se puede

atribuir al acortamiento gradual de los telómeros. A pesar de que p53 necesita a p21^{cip} para mediar el bloqueo del ciclo celular (el-Deiry y cols., 1993), se ha descrito que p21^{cip} es capaz de promover senescencia por una vía independiente de p53 que cursa con el aumento de los niveles intracelulares de ROS (Fang y cols., 1999; Macip y cols., 2002), apoyando así la existencia de otras posibles vías que promuevan la aparición del fenotipo senescente. Sin embargo, la disminución en la expresión de la proteína p21^{cip} observada en células G nos hace descartar la participación de esta vía en la inducción del fenotipo senescente.

La cuestión que surge en este contexto es ¿cómo se induce la senescencia celular si no es por el acortamiento de los telómeros? Parece razonable asumir que en condiciones de estrés se active el bloqueo del ciclo celular, y por tanto no es de extrañar que otras moléculas que forman parte de la maquinaria que controla y regula la progresión del ciclo también estén íntimamente asociadas con la inducción del fenotipo G senescente/no proliferativo. A pesar de que los mecanismos que subyacen al fenotipo senescente son muy variados y específicos de cada tipo celular, se acepta comúnmente que la adquisición de este fenotipo en ciertos tipos celulares puede ser la consecuencia de un ambiente hostil inducido por las condiciones de cultivo (Ksiazek y cols., 2006). En este sentido, parece que en situaciones de estrés (oxidativo o ambiental) la vía de inducción de senescencia está regulada por p16^{INK4A} (Ramirez y cols., 2001). El aumento en la expresión de p16^{INK4A} se ha observado en células senescentes con daños severos en el DNA (Robles y Adami, 1998) y bajo condiciones de estrés oxidativo (Chen, 2000). El papel crucial de p16^{INK4A} en esta respuesta celular se ha confirmado en queratinocitos humanos donde la disminución de los niveles de p16^{INK4A} provoca un aumento de la longevidad celular (Ramirez y cols., 2001). Por el contrario, se ha visto que fibroblastos que senescen por mecanismos independientes de p16^{INK4A}, al ser sometidos a condiciones inadecuadas de cultivo acumulan esta proteína y arrestan su crecimiento (Ramirez y cols., 2001). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de p16^{INK4A} como marcador de senescencia prematura en condiciones de estrés oxidativo y ambiental. Los resultados que se muestran en esta tesis apoyan que la senescencia observada en células G está mediada por un aumento de p16^{INK4A} tanto a nivel de proteína como de su mRNA. El estrés oxidativo se considera uno de los factores responsables de la limitación del crecimiento celular en cultivo. Así, fibroblastos que crecen en presencia de poco oxígeno (~3%) pueden dividirse hasta 60 veces, mientras que una mayor concentración de oxígeno (~20%) disminuye su longevidad hasta 8-10 divisiones (Parrinello y cols., 2003). Asimismo, los niveles de ROS en células derivadas de mesotelio humano en pases tardíos son mucho mayores y están asociados con la manifestación del fenotipo senescente (Ksiazek y cols., 2006). Diversos estudios han sugerido que el estrés oxidativo puede inducir directamente la parada proliferativa mediada por p16^{INK4A} (Chen y cols., 2004; Ksiazek y cols., 2006). Congruentemente, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, en la carbonilación de proteínas y en la expresión de p16^{INK4A} observado en las células con fenotipo G, nos hace presumir que la limitación de la

función mitocondrial tras el tratamiento con OL induce un fuerte estrés oxidativo que acelera la senescencia prematura *in vitro* mediada por la activación de p16^{INK4A}. En este contexto, se ha puesto en marcha un proyecto europeo destinado a identificar antioxidantes mitocondriales que puedan prevenir la senescencia celular (Skulachev y cols., 2009).

Los resultados de esta tesis demuestran que las células senescentes son resistentes a la muerte celular de acuerdo con los datos publicados por otros autores (Dimri, 2005; Li y cols., 2005a; Ryu y cols., 2006; Chen y cols., 2008; Haug y cols., 2008). Puesto que la aparición del fenotipo no proliferativo es consecuencia de la disfunción mitocondrial inducida tras el tratamiento con OL, estos resultados ponen de manifiesto en otro modelo experimental la relevancia de la actividad de la fosforilación oxidativa en la ejecución de la muerte celular (Dey y Moraes, 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Tomiyama y cols., 2006). La senescencia proporciona a las células un salvavidas que les permite escapar del ciclo celular activado por oncogenes como ras (Serrano y cols., 1997) y, en este sentido, se puede considerar como un programa de supresión tumoral (revisado por (Smith y Pereira-Smith, 1996; Itahana y cols., 2004)). Del mismo modo que el fenotipo metabólico de la célula cancerígena puede suponer una diana de gran utilidad para combatir el cáncer, la inducción del fenotipo senescente podría ser útil para bloquear el crecimiento de la célula tumoral. Diversos estudios han descrito la aparición del fenotipo senescente durante el tratamiento con agentes quimioterapéuticos en tumores de mama (te Poele y cols., 2002; Christov y cols., 2003) y pulmón (Roberson y cols., 2005). Sin embargo, la contribución del fenotipo senescente a la regresión del tumor no está clara y se especula que pueda actuar de forma similar a ciertos fármacos citotóxicos que estabilizan la enfermedad (te Poele y cols., 2002).

El proceso de tumorigénesis requiere al menos tres etapas: inmortalización, transformación e invasión y metástasis que se suceden de forma secuencial en la célula (Braithwaite y Rabbitts, 1999). Durante la fase de inmortalización uno de los sucesos que debe tener lugar es la evasión de la senescencia (revisado en (Kondoh, 2008)). Como ya se ha discutido en el modelo de cáncer colorrectal, la transformación de la célula tumoral promueve la adquisición de un fenotipo esencialmente glucolítico (efecto Warburg) (Osthus y cols., 2000; Ramanathan y cols., 2005; Bensaad y cols., 2006; Kim y Dang, 2006). Diversos estudios han puesto de manifiesto que esta alteración metabólica también sucede en la etapa de inmortalización celular (Wang y cols., 1998; Attardi y Jacks, 1999; Carnero y cols., 2000; Kim y cols., 2004; Gil y cols., 2005; Kondoh y cols., 2005; Smith y cols., 2006). Más recientemente hemos sugerido que la adquisición del fenotipo glucolítico es consecuencia de la instauración del metabolismo energético que prevalece en la célula proliferativa donde la glucólisis domina las fases S, G2 y M del ciclo celular (Cuezva y cols., 2009; Ortega y cols., 2009a). Los resultados obtenidos en esta tesis en células HepG2 demuestran que la supresión de la función mitocondrial y consiguiente inducción del metabolismo glucolítico también es una característica del fenotipo senescente.

Contrariamente a lo observado en carcinoma colorrectal, donde el estrés mitocondrial conduce a un fenotipo glucolítico hiperproliferativo pero reversible y por tanto, susceptible de tratamiento, en células HepG2 la adquisición del fenotipo glucolítico es irreversible y conduce al arresto de la proliferación celular. Este resultado indica la existencia de grandes diferencias en la respuesta al daño mitocondrial dependiendo del tipo celular que se considere, lo que impide la generalización de estos hallazgos a otras neoplasias. De hecho, la carcinogénesis en colon está ligada a la represión bioenergética de la mitocondria ((Cuezva y cols., 2002) y esta tesis) mientras que en hepatocarcinomas, ya sea de rata (de Heredia y cols., 2000) o humano (Cuezva y cols., 2002), está asociada con la represión de la biogénesis mitocondrial y la consiguiente “dilución” del contenido de orgánulos de la célula (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2007). Por tanto, sugerimos que la respuesta a estímulos que provocan la disfunción mitocondrial es distinta y específica de cada tipo celular, de acuerdo con las grandes diferencias que existen en la estructura y composición molecular de las mitocondrias de los distintos tipos celulares de mamíferos (Pagliarini y cols., 2008). En definitiva, esclarecer la relación molecular existente entre la disfunción mitocondrial, la inducción del metabolismo glucolítico, la senescencia celular y el cáncer contribuirá al tratamiento de esta patología.

5.3. El metabolismo energético aporta una característica fenotípica común a distintas neoplasias.

La implementación de marcadores moleculares para el pronóstico y la terapia del cáncer constituye uno de los objetivos actuales en el campo de la investigación traslacional en oncología. Sin embargo, el déficit de métodos cuantitativos que permitan el uso de marcadores de forma sencilla, barata y reproducible supone una gran desventaja que está dificultando el empleo de los marcadores que se describen en clínica. Como ya hemos indicado, en los últimos años distintas aproximaciones cualitativas han permitido identificar proteínas del metabolismo energético de utilidad como marcadores del diagnóstico y la prognosis de pacientes con cáncer de mama (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008), colon (Cuezva y cols., 2002; Lin y cols., 2008) y pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007), y eventualmente, para establecer la respuesta a quimioterapia (Shin y cols., 2005; Santamaria y cols., 2006; Lin y cols., 2008). Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado una metodología que permite, por vez primera, la cuantificación de proteínas del metabolismo energético en biopsias tumorales (Acebo y cols., 2009). En ese estudio, hemos demostrado que tumores procedentes de distintos tejidos tienen la misma *huella bioenergética* (razón β -F1/GAPDH \sim 1-2), o dicho de otra manera, que el cáncer suprime las diferencias específicas de cada tejido en el fenotipo bioenergético (Acebo y cols., 2009). Coherentemente, los resultados presentados en esta tesis sobre la *huella bioenergética* del panel NCI-60 confirman que el cáncer suprime las diferencias tejido-específicas del

metabolismo energético ya que la razón β -F1/GAPDH es básicamente la misma.

Por otro lado, el cáncer altera la expresión de los marcadores del metabolismo energético celular de forma específica en cada tejido (Acebo y cols., 2009). Es posible que estos cambios resulten de la expresión variable de oncogenes (Ramanathan y cols., 2005; Kim y Dang, 2006; Govindarajan y cols., 2007) y genes supresores de tumor (Matoba y cols., 2006; DeBerardinis y cols., 2008; Gogvadze y cols., 2008) que modulan de forma diferencial el fenotipo bioenergético en los distintos tipos celulares. Ahora bien, también es posible que sea el resultado de la instauración del programa de proliferación celular que inevitablemente está ligado a la represión de la función bioenergética de la mitocondria y la inducción de la glucólisis (Wang y cols., 1976; Brand y Hermfisse, 1997; Cuezva y cols., 2009).

Independientemente de cuál sea el mecanismo que promueve la similitud en el metabolismo energético de las células tumorales, se puede contemplar que todas ellas deriven de un progenitor tumoral común no diferenciado (Ben-Porath y cols., 2008), o bien, se deba a un proceso de desdiferenciación de la mitocondria de la célula tumoral que revierte al fenotipo de células embrionarias. Sea cual sea la vía, lo que es evidente es que la represión de la dotación y función mitocondrial es una condición imprescindible para la progresión del cáncer. Además, esta huella aporta una diana terapéutica común para el tratamiento del cáncer lo que pone de manifiesto su importancia para la traslación al ámbito clínico (Cuezva y cols., 2009).

CONCLUSIONES

1. La regulación de la expresión de la proteína cuello de botella de la fosforilación oxidativa, β -F1-ATPasa, promueve alteraciones en la estructura y función bioenergética de las mitocondrias de células HCT116 y HepG2, apoyando la relevancia del complejo H^+ -ATP sintasa en la organización de la membrana interna mitocondrial.
2. La represión de la diferenciación y función bioenergética de la mitocondria y consiguiente estimulación del metabolismo glucolítico, es una característica fenotípica reversible e imprescindible para la progresión del carcinoma colorrectal. Por el contrario, el mismo tipo de estímulo en hepatocarcinomas favorece la aparición de un fenotipo senescente con represión de la biogénesis mitocondrial y activación irreversible del metabolismo glucolítico, lo que pone de manifiesto la relevancia del tipo celular a la hora de explicar la contribución del metabolismo energético a la progresión del cáncer.
3. La utilización aeróbica de la glucosa es función de la actividad de la fosforilación oxidativa mitocondrial, poniendo de manifiesto la importancia fisiológica del Efecto Pasteur en la biología del cáncer, tal y como enfatizó Otto Warburg a principios del siglo pasado. En este sentido, se demuestra que el índice proteómico (β -F1/GAPDH) que define la *huella bioenergética* expresa la actividad metabólica de la célula tumoral y tiene básicamente el mismo valor independientemente del tipo tumoral que se considere.
4. El metabolismo energético que es competente para la progresión del carcinoma colorrectal y la senescencia celular aporta el fenotipo de resistencia a muerte que está posiblemente mediado por la supresión de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se produce como consecuencia de la represión de la actividad de la H^+ -ATP sintasa.
5. El metabolismo energético del cáncer aporta una diana terapéutica común para distintas neoplasias. Los inhibidores de enzimas de la vía glucolítica (3-BrP y IAA) inducen regresión tumoral y muerte celular por vía necrótica. Por el contrario, los activadores del metabolismo energético mitocondrial (DCA) inducen regresión tumoral por promover el arresto de la proliferación celular y la diferenciación mitocondrial en células HCT116.
6. La inducción de estrés mitocondrial por represión de la expresión de la proteína β -F1-ATPasa en células HepG2, induce un estrés oxidativo que bloquea el crecimiento celular por aparición de un fenotipo de senescencia prematura mediado por la

activación de la vía de p16^{INK4A}-Rb. Este resultado sugiere la posible utilización de esta vía como estrategia antitumoral en carcinoma hepático.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M** (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25: 543-557.
- Acebo P, Giner D, Calvo P, Blanco-Rivero A, Ortega AD, Fernández PL, Roncador G, Fernández-Malavé E, Chamorro M, Cuezva JM** (2009). Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl Oncol*: (En prensa).
- Afshari CA, Vojta PJ, Annab LA, Futreal PA, Willard TB, Barrett JC** (1993). Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp Cell Res* 209: 231-237.
- Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nystrom T** (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299: 1751-1753.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC** (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13742-13747.
- Ammons WS, Wang JW, Yang Z, Tidmarsh GF, Hoffman RM** (2007). A novel alkylating agent, glufosfamide, enhances the activity of gemcitabine in vitro and in vivo. *Neoplasia* 9: 625-633.
- Amuthan G, Biswas G, Ananadatheerthavarada HK, Vijayasarathy C, Shephard HM, Avadhani NG** (2002). Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21: 7839-7849.
- Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG** (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *Embo J* 20: 1910-1920.
- Arora KK, Pedersen PL** (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem* 263: 17422-17428.

- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J** (2004). The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 279: 40392-40399.
- Attardi G, Schatz G** (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333.
- Attardi LD, Jacks T** (1999). The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci* 55: 48-63.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V** (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377: 347-355.
- Barata JT, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA** (2004). Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 200: 659-669.
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M** (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 91: 47-53.
- Barshop BA, Naviaux RK, McGowan KA, Levine F, Nyhan WL, Loupis-Geller A, Haas RH** (2004). Chronic treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate. *Mol Genet Metab* 83: 138-149.
- Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV** (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 67: 8180-8187.
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA** (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH** (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107-120.
- Bensaad K, Vousden KH** (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 17:

286-291.

- Berube NG, Smith JR, Pereira-Smith OM** (1998). The genetics of cellular senescence. *Am J Hum Genet* 62: 1015-1019.
- Bickis IJ, Quastel JH** (1965). Effects of Metabolic Inhibitors on Energy Metabolism of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Nature* 205: 44-46.
- Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HK, Vijayasarathy C, Zaidi M, Kotlikoff M, Avadhani NG** (1999). Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J* 18: 522-533.
- Blander G, de Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L** (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 38966-38969.
- Blower PE, Verducci JS, Lin S, Zhou J, Chung JH, Dai Z, Liu CG, Reinhold W, Lorenzi PL, Kaldjian EP, Croce CM, Weinstein JN, Sadee W** (2007). MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel. *Mol Cancer Ther* 6: 1483-1491.
- Board M, Colquhoun A, Newsholme EA** (1995). High Km glucose-phosphorylating (glucokinase) activities in a range of tumor cell lines and inhibition of rates of tumor growth by the specific enzyme inhibitor mannoheptulose. *Cancer Res* 55: 3278-3285.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE** (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.
- Bond J, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wyllie F** (1996). Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* 13: 2097-2104.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED** (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and

inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11: 37-51.

Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, Lee WN, Brandes JL, Bassilian S, Yusuf FI, Williams RD, Muscarella P, Melvin WS, Schirmer WJ (1997). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* 57: 4242-4248.

Boyer PD (1997). The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717-749.

Braithwaite KL, Rabbitts PH (1999). Multi-step evolution of lung cancer. *Semin Cancer Biol* 9: 255-265.

Brand K (1985). Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem J* 228: 353-361.

Brand KA, Hermfisse U (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 11: 388-395.

Brandon M, Baldi P, Wallace DC (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25: 4647-4662.

Bravo C, Minauro-Sanmiguel F, Morales-Rios E, Rodriguez-Zavala JS, Garcia JJ (2004). Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J Bioenerg Biomembr* 36: 257-264.

Breen GA (1988). Bovine liver cDNA clones encoding a precursor of the alpha-subunit of the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 264-269.

Briasoulis E, Pavlidis N, Terret C, Bauer J, Fiedler W, Schoffski P, Raoul JL, Hess D, Selvais R, Lacombe D, Bachmann P, Fumoleau P (2003). Glufosfamide administered using a 1-hour infusion given as first-line treatment for advanced pancreatic cancer. A phase II trial of the EORTC-new drug development group. *Eur J Cancer* 39: 2334-2340.

Bringold F, Serrano M (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317-329.

- Brown J** (1962). Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metabolism* 11: 1098-1112.
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS** (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 1: 409-414.
- Buc HA, Demaugre F, Cepanec C, Leroux JP** (1980). The metabolic effects of oxalate on intact red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 628: 136-144.
- Budihardjo, II, Walker DL, Svingen PA, Buckwalter CA, Desnoyers S, Eckdahl S, Shah GM, Poirier GG, Reid JM, Ames MM, Kaufmann SH** (1998). 6-Aminonicotinamide sensitizes human tumor cell lines to cisplatin. *Clin Cancer Res* 4: 117-130.
- Bussey KJ, Chin K, Lababidi S, Reimers M, Reinhold WC, Kuo WL, Gwadry F, Ajay, Kouros-Mehr H, Fridlyand J, Jain A, Collins C, Nishizuka S, Tonon G, Roschke A, Gehlhaus K, Kirsch I, Scudiero DA, Gray JW, Weinstein JN** (2006). Integrating data on DNA copy number with gene expression levels and drug sensitivities in the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther* 5: 853-867.
- Butow RA, Avadhani NG** (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14: 1-15.
- Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchon MR** (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* 8: 13-25.
- Cantley LC, Neel BG** (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4240-4245.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J** (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD(+) metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060.
- Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ** (2008). Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 68: 1223-1231.

- Capaldi RA, Aggeler R** (2002). Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27: 154-160.
- Carmona MC, Iglesias R, Obregon MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giral M** (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277: 21489-21498.
- Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH** (2000). p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol* 2: 148-155.
- Carriere A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L** (2004). Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem* 279: 40462-40469.
- Cavalli LR, Varella Garcia M, Liang BC** (1997). Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ* 8: 1189-1198.
- Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, Du J, Aykin-Burns N, Smith BJ, Li L, Spitz DR, Cullen JJ** (2008). 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* 44: 322-331.
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW** (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 275: 21960-21968.
- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG** (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25: 1157-1163.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC** (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62: 6674-6681.
- Cuezva JM, Ortega AD, Willers I, Sanchez-Cenizo L, Aldea M, Sanchez-Arago M** (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*: En prensa.

- Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, López de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM** (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 365-377.
- Cuezva JM, Sanchez-Arago M, Sala S, Blanco-Rivero A, Ortega AD** (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 259-265.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S** (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29: 323-333.
- Chen JH, Stoeber K, Kingsbury S, Ozanne SE, Williams GH, Hales CN** (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 49439-49446.
- Chen QM** (2000). Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann N Y Acad Sci* 908: 111-125.
- Chen W, Kang J, Xia J, Li Y, Yang B, Chen B, Sun W, Song X, Xiang W, Wang X, Wang F, Wan Y, Bi Z** (2008). p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts. *Int J Mol Med* 21: 645-653.
- Chen Z, Odstreil EA, Tu BP, McKnight SL** (2007). Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* 316: 1916-1919.
- Cheng JQ, Altomare DA, Klein MA, Lee WC, Kruh GD, Lissy NA, Testa JR** (1997). Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene* 14: 2793-2801.
- Chiorean EG, Dragovich T, Hamm J, Langmuir VK, Kroll S, Jung DT, Colowick AB, Tidmarsh GF, Loehrer PJ** (2008). A Phase 1 dose-escalation trial of glufosfamide in combination with gemcitabine in solid tumors including pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 61: 1019-1026.
- Chiu CH, Lin WD, Huang SY, Lee YH** (2004). Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* 18: 1970-1975.

- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC** (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233.
- Christov KT, Shilkaitis AL, Kim ES, Steele VE, Lubet RA** (2003). Chemopreventive agents induce a senescence-like phenotype in rat mammary tumours. *Eur J Cancer* 39: 230-239.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198.
- Dai Z, Barbacioru C, Huang Y, Sadee W** (2006). Prediction of anticancer drug potency from expression of genes involved in growth factor signaling. *Pharm Res* 23: 336-349.
- Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J** (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 51-56.
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ** (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-956.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F** (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.
- de Heredia ML, Izquierdo JM, Cuezva JM** (2000). A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 275: 7430-7437.
- De Lena M, Lorusso V, Latorre A, Fanizza G, Gargano G, Caporusso L, Guida M, Catino A, Crucitta E, Sambiasi D, Mazzei A** (2001). Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study. *Eur J Cancer* 37: 364-368.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB** (2008). The biology of

cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.

DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19345-19350.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17: 2215-2223.

Dey R, Moraes CT (2000). Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275: 7087-7094.

Di Cosimo S, Ferretti G, Papaldo P, Carlini P, Fabi A, Cognetti F (2003). Lonidamine: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of solid tumors. *Drugs Today (Barc)* 39: 157-174.

Di Liegro CM, Bellafigliore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM (2000). 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochem J* 352 Pt 1: 109-115.

Di Micco R, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F (2007). Breaking news: high-speed race ends in arrest--how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol* 17: 529-536.

Dimri GP (2005). What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* 7: 505-512.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.

Dollner R, Dietz A, Kopun M, Helbig M, Wallner F, Granzow C (2004). Ex vivo responsiveness of head and neck squamous cell carcinoma to glufosfamide, a novel alkylating agent. *Anticancer Res* 24: 2947-2951.

- Drayton S, Peters G** (2002). Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 12: 98-104.
- Dulic V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH** (2000). Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* 20: 6741-6754.
- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ** (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem* 270: 29083-29089.
- Edinger AL, Thompson CB** (2002). Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 13: 2276-2288.
- Efferth T, Oesch F** (2004). Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochem Pharmacol* 68: 3-10.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB** (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892-3899.
- Evans MJ, Scarpulla RC** (1990). NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4: 1023-1034.
- Fahim FA, Esmat AY, Mady EA, Ibrahim EK** (2003). Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid Ehrlich carcinoma growth in mice. *Biol Res* 36: 253-262.
- Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA** (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 18: 330-337.
- Fang L, Igarashi M, Leung J, Sugrue MM, Lee SW, Aaronson SA** (1999). p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* 18: 2789-2797.

- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P** (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425-434.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J** (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88: 41-56.
- Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B** (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17: 1115-1129.
- Ferri KF, Kroemer G** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3: E255-263.
- Flores AI, Cuezva JM** (1997). Identification of sequence similarity between 60 kDa and 70 kDa molecular chaperones: evidence for a common evolutionary background? *Biochem J* 322 (Pt 2): 641-647.
- Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C** (1981). Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 66: 497-499.
- Freyssenet D, Di Carlo M, Hood DA** (1999). Calcium-dependent regulation of cytochrome c gene expression in skeletal muscle cells. Identification of a protein kinase c-dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 9305-9311.
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL** (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129: 111-122.
- Fulda S, Debatin KM** (2005). Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid. *Neoplasia* 7: 162-170.
- Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, Clements MO, Bourboulia D, Pedley RB, Moncada S, Boshoff C** (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6223-6228.
- Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G** (2006). Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4812-4830.

- Garber K** (2006). Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312: 1158-1159.
- Garesse R, Vallejo CG** (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16.
- Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL** (2002). Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res* 62: 3909-3913.
- Giaccone G, Smit EF, de Jonge M, Dansin E, Briasoulis E, Ardizzoni A, Douillard JY, Spaeth D, Lacombe D, Baron B, Bachmann P, Fumoleau P** (2004). Glufosfamide administered by 1-hour infusion as a second-line treatment for advanced non-small cell lung cancer; a phase II trial of the EORTC-New Drug Development Group. *Eur J Cancer* 40: 667-672.
- Gil J, Kerai P, Lleonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, Carnero A, Beach D** (2005). immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res* 65: 2179-2185.
- Giraud MF, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, di Rago JP, Velours J** (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta* 1555: 174-180.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B** (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* 18: 165-173.
- Goldin N, Arzoin L, Heyfets A, Israelson A, Zaslavsky Z, Bravman T, Bronner V, Notcovich A, Shoshan-Barmatz V, Flescher E** (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene* 27: 4636-4643.
- Gonzalez-Cabo P, Vazquez-Manrique RP, Garcia-Gimeno MA, Sanz P, Palau F** (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet* 14: 2091-2098.
- Govindarajan B, Shah A, Cohen C, Arnold RS, Schechner J, Chung J, Mercurio AM, Alani R, Ryu B, Fan CY, Cuezva JM, Martinez M, Arbiser JL** (2005). Malignant transformation of human cells by constitutive expression of platelet-derived growth

factor-BB. *J Biol Chem* 280: 13936-13943.

Govindarajan B, Sligh JE, Vincent BJ, Li M, Canter JA, Nickoloff BJ, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Oberley L, Zhang Y, Slingerland J, Arnold RS, Lambeth JD, Cohen C, Hilenski L, Griendling K, Martinez-Diez M, Cuezva JM, Arbiser JL (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 117: 719-729.

Goyon V, Fronzes R, Salin B, di-Rago JP, Velours J, Brethes D (2008). Yeast cells depleted in Atp14p fail to assemble Atp6p within the ATP synthase and exhibit altered mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 283: 9749-9758.

Green DR (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-698.

Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.

Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M (2000). Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol Cell Biol* 20: 3125-3136.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226.

Hamilton B, Dong Y, Shindo M, Liu W, Odell I, Ruvkun G, Lee SS (2005). A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev* 19: 1544-1555.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67: 821-855.

Harley CB (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-282.

Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.

- Harrigan PM, Douple EB, Wills ML** (1992). Potentiation of hyperthermia in a murine tumour by metabolic inhibitors rhodamine 123 and 2-deoxy-D-glucose or 5-thio-D-glucose. *Int J Hyperthermia* 8: 475-483.
- Harris MH, Vander Heiden MG, Kron SJ, Thompson CB** (2000). Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20: 3590-3596.
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB** (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8: 311-321.
- Haug K, Kravik KL, De Angelis PM** (2008). Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 28: 583-592.
- Hayflick L, Moorhead PS** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Heiligtag SJ, Bredehorst R, David KA** (2002). Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 9: 1017-1025.
- Hernlund E, Ihlund LS, Khan O, Ates YO, Linder S, Panaretakis T, Shoshan MC** (2008). Potentiation of chemotherapeutic drugs by energy metabolism inhibitors 2-deoxyglucose and etomoxir. *Int J Cancer* 123: 476-483.
- Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A, Fernandez M, Roncero C, Benito M, Fabregat I** (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 15: 741-751.
- Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtiskova A, Houstek J, Simonnet H, Godinot C** (2005). A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 26: 531-539.
- Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE, Halaban R** (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270-5282.

- Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, Richardson A, Violette S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Bauerlein EL, Hahn WC, Gelman RS, Allred C, Bissell MJ, Schnitt S, Polyak K** (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 13: 394-406.
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr.** (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1: 822-826.
- Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, Esumi H** (2001). Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 562-567.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL** (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590.
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L** (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8: 143-153.
- Ishikawa F, Akimoto T, Yamamoto H, Araki Y, Yoshie T, Mori K, Hayashi H, Nose K, Shibamura M** (2009). Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem*: En prensa.
- Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J** (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320: 661-664.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM** (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26: 2095-2104.
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM** (2004). Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17-20.

- Itahana K, Campisi J, Dimri GP** (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5: 1-10.
- Itahana K, Dimri G, Campisi J** (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268: 2784-2791.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr.** (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464-468.
- Ivanov VN, Hei TK** (2004). Arsenite sensitizes human melanomas to apoptosis via tumor necrosis factor α -mediated pathway. *J Biol Chem* 279: 22747-22758.
- Ivanov VN, Hei TK** (2005). Combined treatment with EGFR inhibitors and arsenite upregulated apoptosis in human EGFR-positive melanomas: a role of suppression of the PI3K-AKT pathway. *Oncogene* 24: 616-626.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (1993). Evidence of post-transcriptional regulation in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 55-60.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (1997). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17: 5255-5268.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (2000). Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem J* 346 Pt 3: 849-855.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (2005). Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 433: 481-486.
- Izquierdo JM, Jiménez E, Cuezva JM** (1995a). Hypothyroidism affects the expression of the beta-F1-ATPase gene and limits mitochondrial proliferation in rat liver at all stages of development. *Eur J Biochem* 232: 344-350.
- Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM** (1995b). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression

during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270: 10342-10350.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.

Jaattela M (2004). Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23: 2746-2756.

Jazwinski SM (2005). The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. *Gene* 354: 22-27.

Jelks KB, Miller MG (2001). α -Chlorohydrin inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in multiple organs as well as in sperm. *Toxicol Sci* 62: 115-123.

Jones AR, Cooper TG (1997). Metabolism of ³⁶Cl-ornidazole after oral application to the male rat in relation to its antifertility activity. *Xenobiotica* 27: 711-721.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-293.

Jones RG, Thompson CB (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23: 537-548.

Kaelin WG, Jr. (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21: 950-958.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 267: 3828-3835.

Karrasch S, Walker JE (1999). Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol* 290: 379-384.

Kasibhatla S, Tseng B (2003). Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2: 573-580.

- Kasperczyk H, La Ferla-Bruhl K, Westhoff MA, Behrend L, Zwacka RM, Debatin KM, Fulda S** (2005). Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* 24: 6945-6956.
- Kim J, Lee JH, Iyer VR** (2008). Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PLoS ONE* 3: e1798.
- Kim JH, Alfieri AA, Kim SH, Young CW** (1986). Potentiation of radiation effects on two murine tumors by lonidamine. *Cancer Res* 46: 1120-1123.
- Kim JH, Kim SH, Hahn EW, Song CW** (1978). 5-Thio-D-glucose selectively potentiates hyperthermic killing of hypoxic tumor cells. *Science* 200: 206-207.
- Kim JW, Dang CV** (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66: 8927-8930.
- Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV** (2007a). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27: 7381-7393.
- Kim JW, Zeller KI, Wang Y, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV** (2004). Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol* 24: 5923-5936.
- Kim JY, Kim YH, Chang I, Kim S, Pak YK, Oh BH, Yagita H, Jung YK, Oh YJ, Lee MS** (2002). Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 3139-3148.
- Kim W, Yoon JH, Jeong JM, Cheon GJ, Lee TS, Yang JI, Park SC, Lee HS** (2007b). Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 6: 2554-2562.
- King A, Selak MA, Gottlieb E** (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25: 4675-4682.
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill L A, Qwarnstrom EE, Dower SK**

- (2004). Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 279: 42703-42708.
- Klaunig JE, Kamendulis LM** (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-267.
- Klevecz RR, Bolen J, Forrest G, Murray DB** (2004). A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1200-1205.
- Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL** (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 269-275.
- Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr.** (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 1: 237-246.
- Kondoh H** (2008). Cellular life span and the Warburg effect. *Exp Cell Res* 314: 1923-1928.
- Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D** (2005). Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 65: 177-185.
- Krebs H** (1981). Otto Warburg: cell physiologist, biochemist and eccentric (Oxford, UK, Clarendon).
- Krieg RC, Knuechel R, Schiffmann E, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd, Herrmann PC** (2004). Mitochondrial proteome: cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics* 4: 2789-2795.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche Rigon M** (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-642.
- Kroemer G, Pouyssegur J** (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13: 472-482.
- Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A, Witowski J** (2008). Oxidative stress-mediated

early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med* 45: 460-467.

Ksiazek K, Piwocka K, Brzezinska A, Sikora E, Zabel M, Breborowicz A, Jorres A, Witowski J (2006). Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. *J Appl Physiol* 100: 988-995.

Kuhajda FP (2006). Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 66: 5977-5980.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR (1994). Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6379-6383.

Kulawiec M, Arnouk H, Desouki MM, Kazim L, Still I, Singh KK (2006). Proteomic analysis of mitochondria-to-nucleus retrograde response in human cancer. *Cancer Biol Ther* 5: 967-975.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Laszlo J, Humphreys SR, Goldin A (1960). Effects of glucose analogues (2-deoxy-D-glucose, 2-deoxy-D-galactose) on experimental tumors. *J Natl Cancer Inst* 24: 267-281.

Lee JK, Havaleshko DM, Cho H, Weinstein JN, Kaldjian EP, Karpovich J, Grimshaw A, Theodorescu D (2007). A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13086-13091.

Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273: 6417-6423.

Li CH, Tzeng SL, Cheng YW, Kang JJ (2005a). Chloramphenicol-induced mitochondrial stress increases p21 expression and prevents cell apoptosis through a p21-dependent pathway. *J Biol Chem* 280: 26193-26199.

- Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV (2005b).** Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25: 6225-6234.
- Lin PC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chang SC (2008).** Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis* 23: 1223-1232.
- Liotta LA, Kohn EC (2003).** Cancer's deadly signature. *Nat Genet* 33: 10-11.
- López-Abente GC, Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer CNdE, ISCIH (2007).** La situación del cáncer en España (Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo).
- Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, Lopez-Encuentra A, Ballestin C, Cuezva JM (2007).** Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67: 9013-9017.
- Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A (2005).** Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 280: 41928-41939.
- Luciakova K, Kuzela S (1984).** Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria. *FEBS Lett* 177: 85-88.
- Lucken-Ardjomande S, Martinou JC (2005).** Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J Cell Sci* 118: 473-483.
- Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santaren JF, Cuezva JM (1993).** Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 268: 1868-1875.
- Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA (2000).** Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 12: 705-709.
- Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE (1993).** F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of

the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J* 295: 799-806.

Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, Gadd M, Chatfield E, Kessler J, Baer TM, Erlander MG, Sgroi DC (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5974-5979.

Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA (2003). Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 23: 8576-8585.

Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson SA (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *Embo J* 21: 2180-2188.

Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Colloff JL, Rathmell JC (2008). Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol*.

Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ (2004). Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 116-122.

Mandal S, Guptan P, Owusu-Ansah E, Banerjee U (2005). Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell* 9: 843-854.

Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM (2006). Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 1: e107.

Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, De Young LR, Lampidis TJ (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res* 64: 31-34.

Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC

- (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114: 241-253.
- Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL** (1997). Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 272: 22776-22780.
- Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL** (1995). Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J Biol Chem* 270: 16918-16925.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM** (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653.
- Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC** (1998). The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1: 327-336.
- McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, Wu H, Schell MJ, Tsang TM, Teahan O, Zhou S, Califano JA, Jeoung NH, Harris RA, Verma A** (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem* 283: 22700-22708.
- Menendez JA, Lupu R** (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7: 763-777.
- Merkwirth C, Langer T** (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793: 27-32.
- Miceli MV, Jazwinski SM** (2005). Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res* 302: 270-280.
- Michelakis ED, Webster L, Mackey JR** (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 99: 989-994.
- Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP** (1997). Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer*

Res 3: 2115-2120.

Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JJ (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12356-12358.

Mohanti BK, Rath GK, Anantha N, Kannan V, Das BS, Chandramouli BA, Banerjee AK, Das S, Jena A, Ravichandran R, Sahi UP, Kumar R, Kapoor N, Kalia VK, Dwarakanath BS, Jain V (1996). Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35: 103-111.

Morais R, Zinkewich-Peotti K, Parent M, Wang H, Babai F, Zollinger M (1994). Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer Res* 54: 3889-3896.

Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM (2008). The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* 7: 1054-1066.

Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A (2003). Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem* 278: 12759-12768.

Muschen M, Moers C, Warskulat U, Even J, Niederacher D, Beckmann MW (2000). CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology* 99: 69-77.

Nautiyal S, DeRisi JL, Blackburn EH (2002). The genome-wide expression response to telomerase deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9316-9321.

Neckelmann N, Warner CK, Chung A, Kudoh J, Minoshima S, Fukuyama R, Maekawa M, Shimizu Y, Shimizu N, Liu JD, al e (1989). The human ATP synthase beta subunit gene: sequence analysis, chromosome assignment, and differential expression. *Genomics* 5: 829-843.

Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003). Mitochondria: releasing power for life and

unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-490.

Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 51: 146-153.

Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Pozzi S, Breitkreutz I, Cirstea D, Santo L, Richardson P, Anderson KC (2008). Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol* 141: 659-671.

Ortega AD, Cuezva JM (2004). The organelles I: Mitochondrial failure and neurodegeneration. en *Brain damage and repair*, (Ed. Herdegen, T, Delgado-García, JM). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 95-109.

Ortega AD, Sala S, Espinosa E, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM (2008). HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis* 29: 2053-2061.

Ortega AD, Sanchez-Arago M, Giner-Sanchez D, Sanchez-Cenizo L, Willers I, Cuezva JM (2009a). Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett* 276: 125-135.

Ortega AD, Willers I, Sala S, Cuezva JM (2009b). The human homolog of Rasputin G3BP1 controls the bioenergetic phenotype of the cancer cell. (En preparación).

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275: 21797-21800.

Oudard S, Carpentier A, Banu E, Fauchon F, Celerier D, Poupon MF, Dutrillaux B, Andrieu JM, Delattre JY (2003). Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 63: 81-86.

Ozturk M, Arslan-Ergul A, Bagislar S, Senturk S, Yuzugullu H (2008). Senescence and immortality in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. En prensa.

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA,

- Mootha VK** (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134: 112-123.
- Pan D, Fujimoto M, Lopes A, Wang YX** (2009). Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism. *Cell* 137: 73-86.
- Pan JG, Mak TW** (2007). Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era? *Sci STKE* 2007: pe14.
- Panaretakis T, Shabalina IG, Grander D, Shoshan MC, DePierre JW** (2001). Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 173: 56-64.
- Papaldo P, Lopez M, Cortesi E, Cammilluzzi E, Antimi M, Terzoli E, Lepidini G, Vici P, Barone C, Ferretti G, Di Cosimo S, Nistico C, Carlini P, Conti F, Di Lauro L, Botti C, Vitucci C, Fabi A, Giannarelli D, Marolla P** (2003). Addition of either lonidamine or granulocyte colony-stimulating factor does not improve survival in early breast cancer patients treated with high-dose epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 21: 3462-3468.
- Park HS, Chung JW, Jae HJ, Kim YI, Son KR, Lee MJ, Park JH, Kang WJ, Yoon JH, Chung H, Lee K** (2007). FDG-PET for evaluating the antitumor effect of intraarterial 3-bromopyruvate administration in a rabbit VX2 liver tumor model. *Korean J Radiol* 8: 216-224.
- Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K, Lee MS** (2004). Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279: 7512-7520.
- Parlo RA, Coleman PS** (1986). Continuous pyruvate carbon flux to newly synthesized cholesterol and the suppressed evolution of pyruvate-generated CO₂ in tumors: further evidence for a persistent truncated Krebs cycle in hepatomas. *Biochim Biophys Acta* 886: 169-176.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J** (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741-747.

- Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P** (1993). Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75: 1227-1236.
- Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TB, von Zglinicki T** (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5: e110.
- Passos JF, von Zglinicki T** (2005). Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp Gerontol* 40: 466-472.
- Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J** (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* 21: 221-230.
- Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P** (2006). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 175: 913-923.
- Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA** (2002). Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 1: 683-695.
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC** (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 719-724.
- Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A** (1994). Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol* 236: 199-208.
- Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB** (2001). Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* 47: 102-110.
- Plas DR, Thompson CB** (2002). Cell metabolism in the regulation of programmed cell

death. *Trends Endocrinol Metab* 13: 75-78.

Plas DR, Thompson CB (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24: 7435-7442.

Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, Ebersberger I, Nakashima T, Sarao R, Neely G, Esterbauer H, Kozlov A, Kahn CR, Kroemer G, Rustin P, Burcelin R, Penninger JM (2007). Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131: 476-491.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286: 1368-1371.

Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, Ennamany R, Lee WN, Boros LG, Cascante M (1999). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* 456: 113-118.

Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5992-5997.

Ramaswamy S, Golub TR (2002). DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20: 1932-1941.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54.

Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15: 398-403.

Ramos-Montoya A, Lee WN, Bassilian S, Lim S, Trebukhina RV, Kazhyna MV, Ciudad CJ, Noe V, Centelles JJ, Cascante M (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* 119: 2733-2741.

- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB** (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23: 7315-7328.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G** (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192: 131-137.
- Reed JC** (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776.
- Reinke H, Gatfield D** (2006). Genome-wide oscillation of transcription in yeast. *Trends Biochem Sci* 31: 189-191.
- Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martin C, Cuezva JM** (1997). Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 324 (Pt 2): 635-643.
- Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM** (2002). Assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the beta-subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal cis-acting elements and a complex set of cellular trans-acting proteins. *Biochem J* 365: 417-428.
- Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J** (1996). Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 23: 1641-1674.
- Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, Schubert M, Michael L, Zhang CY, Ueki K, Michael MD, 2nd, Lowell BB, Kahn CR** (2000). Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12239-12243.
- Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY** (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 65: 2795-2803.
- Robey RB, Hay N** (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25: 4683-4696.
- Robles SJ, Adami GR** (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to

p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16: 1113-1123.

Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, McTyre N, Bussey KJ, Lababidi S, Scudiero DA, Weinstein JN, Kirsch IR (2003). Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res* 63: 8634-8647.

Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64: 985-993.

Rotem R, Heyfets A, Fingrut O, Blickstein D, Shaklai M, Flescher E (2005). Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer Res* 65: 1984-1993.

Ruas M, Peters G (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378: F115-177.

Ryu SJ, Cho KA, Oh YS, Park SC (2006). Role of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase for senescence-associated apoptosis resistance. *Apoptosis* 11: 303-313.

Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R (2006). Cyclin d1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 5449-5469.

Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27: 925-935.

Satrustegui J, Pardo B, Del Arco A (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 87: 29-67.

Scarpulla RC (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88: 611-638.

Schagger H, von Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199: 223-231.

- Schieke SM, McCoy JP, Jr., Finkel T** (2008). Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle* 7: 1782-1787.
- Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Jr., Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, Finkel T** (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 281: 27643-27652.
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M** (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281: 977-981.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E** (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64: 2627-2633.
- Seker H, Bertram B, Burkle A, Kaina B, Pohl J, Koepsell H, Wiesser M** (2000). Mechanistic aspects of the cytotoxic activity of glufosfamide, a new tumour therapeutic agent. *Br J Cancer* 82: 629-634.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E** (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7: 77-85.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL** (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757-23763.
- Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G** (2003). Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278: 6824-6830.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW** (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
- Shakya A, Cooksey R, Cox JE, Wang V, McClain DA, Tantin D** (2009). Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. *Nat Cell*

Biol 11: 320-327.

Shaw RJ (2006). Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18: 598-608.

Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP (2002). Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 8149-8157.

Sherr CJ (1998). Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 12: 2984-2991.

Sherr CJ, DePinho RA (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102: 407-410.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.

Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H, Ohta S (2005). Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 65: 1655-1663.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6658-6663.

Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ, Park JG (2005). Down-regulation of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 65: 3162-3170.

Shinohara Y, Ichihara J, Terada H (1991). Remarkably enhanced expression of the type II hexokinase in rat hepatoma cell line AH130. *FEBS Lett* 291: 55-57.

Shoemaker RH (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6: 813-823.

Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, Bouvier R, Schagger H, Godinot C (2002). Low mitochondrial respiratory chain content correlates with

tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 23: 759-768.

Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR (2007). 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res* 67: 3364-3370.

Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Erichev VP, Filenko OF, Kalinina NI, Kapelko VI, Kolosova NG, Kopnin BP, Korshunova GA, Lichinitser MR, Obukhova LA, Pasyukova EG, Pisarenko OI, Roginsky VA, Ruuge EK, Senin, II, Severina, II, Skulachev MV, Spivak IM, Tashlitsky VN, Tkachuk VA, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zorov DB (2009). An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta* 1787: 437-461.

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23: 2809-2818.

Smith JR, Pereira-Smith OM (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273: 63-67.

Smith TA, Sharma RI, Thompson AM, Paulin FE (2006). Tumor 18F-FDG incorporation is enhanced by attenuation of P53 function in breast cancer cells in vitro. *J Nucl Med* 47: 1525-1530.

Smogorzewska A, de Lange T (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73: 177-208.

Spiegelman BM (2007). Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 287: 60-63; discussion 63-69.

Stacpoole PW (1989). The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38: 1124-1144.

Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-2117.

Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A (2007). Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer*

Res 67: 1602-1608.

Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR, Kuhlbrandt W (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *Embo J* 27: 1154-1160.

Suzuki T, Minagawa S, Michishita E, Ogino H, Fujii M, Mitsui Y, Ayusawa D (2001). Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp Gerontol* 36: 465-474.

Tahara H, Sato E, Noda A, Ide T (1995). Increase in expression level of p21^{sdi1/cip1/waf1} with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene* 10: 835-840.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 397-402.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62: 1876-1883.

Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC (1981). Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 41: 73-81.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6: 529-535.

Testa JR, Bellacosa A (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10983-10985.

Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14: 3857-3864.

Thomas D, Bron P, Weimann T, Dautant A, Giraud MF, Paumard P, Salin B, Cavalier

- A, Velours J, Brethes D** (2008). Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol Cell* 100: 591-601.
- Tian M, Zhang H, Higuchi T, Oriuchi N, Nakasone Y, Takata K, Nakajima N, Mogi K, Endo K** (2005). Hexokinase-II expression in untreated oral squamous cell carcinoma: comparison with FDG PET imaging. *Ann Nucl Med* 19: 335-338.
- Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samejima H, Kuchino Y, Kitanaka C** (2006). Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 98: 1462-1473.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG** (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423.
- Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, McKnight SL** (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310: 1152-1158.
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G** (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *Embo J* 23: 4679-4689.
- Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J, Cuezva JM** (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263: 7767-7775.
- Vali M, Vossen JA, Buijs M, Engles JM, Liapi E, Ventura VP, Khwaja A, Acha-Ngwodo O, Shanmugasundaram G, Syed L, Wahl RL, Geschwind JF** (2008). Targeting of VX2 rabbit liver tumor by selective delivery of 3-bromopyruvate: a biodistribution and survival study. *J Pharmacol Exp Ther* 327: 32-37.
- Van den Bogert C, Muus P, Haanen C, Pennings A, Melis TE, Kroon AM** (1988). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells. *Exp Cell Res* 178: 143-153.

- van Waveren C, Sun Y, Cheung HS, Moraes CT** (2006). Oxidative phosphorylation dysfunction modulates expression of extracellular matrix--remodeling genes and invasion. *Carcinogenesis* 27: 409-418.
- Vansteenkiste J, Fischer BM, Doms C, Mortensen J** (2004). Positron-emission tomography in prognostic and therapeutic assessment of lung cancer: systematic review. *Lancet Oncol* 5: 531-540.
- Varshney R, Adhikari JS, Dwarakanath BS** (2003). Contribution of oxidative stress to radiosensitization by a combination of 2-DG and 6-AN in human cancer cell line. *Indian J Exp Biol* 41: 1384-1391.
- Varshney R, Dwarakanath B, Jain V** (2005). Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells. *Int J Radiat Biol* 81: 397-408.
- Vaughn AE, Deshmukh M** (2008). Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10: 1477-1483.
- Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC** (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7: 2431-2445.
- Vogelstein B, Kinzler KW** (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-799.
- Votyakova TV, Reynolds IJ** (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277.
- Wagner M, Jansen-Durr P** (2000). Replicative senescence of human primary cells--molecules and mechanisms. *Exp Gerontol* 35: 729-732.
- Wallace DC** (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407.
- Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, Yang J, Fu M, Leader JE, Quong A, Novikoff PM, Pestell RG** (2006). Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11567-11572.

- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ** (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12: 1769-1774.
- Wang T, Marquardt C, Foker J** (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261: 702-705.
- Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M** (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20: 760-769.
- Wang X** (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-2933.
- Warburg O** (1930). Metabolism of tumors (London, Arnold Constable).
- Warburg O** (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-270.
- Warburg O** (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.
- Warburg O** (1966). Annual meeting of Nobelists at Lindau, Germany. *English Edition by Dean Burk, Natinal Cancer Institute, Bethesda, MD*.
- Weinhouse S** (1976). The Warburg hypothesis fifty years later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 87: 115-126.
- Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, Zhao Y, Rathmell JC** (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 111: 2101-2111.
- Wong JY, Huggins GS, Debidda M, Munshi NC, De Vivo I** (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* 109: 394-402.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS** (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296: 349-352.
- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF** (2003). Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 267-275.

- Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC, McMillin JB** (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11399-11404.
- Xu LZ, Weber IT, Harrison RW, Gidh-Jain M, Pilgis SJ** (1995). Sugar specificity of human beta-cell glucokinase: correlation of molecular models with kinetic measurements. *Biochemistry* 34: 6083-6092.
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P** (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65: 613-621.
- Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, Strong RK, Zurakowski D, Moses MA** (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3913-3918.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Oh-Hara T, Tsuruo T** (2003). Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res* 63: 831-837.
- Yao J, Weremowicz S, Feng B, Gentleman RC, Marks JR, Gelman R, Brennan C, Polyak K** (2006). Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res* 66: 4065-4078.
- Yee KS, Vousden KH** (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* 26: 1317-1322.
- Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL** (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11: 407-420.
- Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ** (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo J* 21: 4411-4419.

Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 18: 1272-1282.

ANEXO I

Material suplementario A1: Análisis bioinformático de las micromatrices de DNA.

A. Estudio de la calidad de las matrices.

Con el fin de comprobar la calidad de las matrices de DNA se estudiaron los siguientes parámetros:

1. *P call %*: indica el porcentaje de transcritos detectados como presentes en una matriz. En condiciones de procesamiento adecuadas, este valor sirve para evaluar la calidad de la muestra.

2- *Array Outlier*: indica el porcentaje de transcritos cuyos niveles en una matriz son inconsistentes con los niveles en el resto de matrices del experimento. El programa de análisis utilizado, dChip (www.dchip.org), recomienda tomar con precaución aquellas muestras que superen el valor de 5%, y eliminar aquellas que superen el 15%. Un valor superior indicaría una imagen potencialmente contaminada por rastros de burbujas, arañazos o un problema a nivel de preparación o hibridación de la muestra.

3- *Normalized Unscaled Standard Error (NUSE)*: El paquete de BioConductor “affyPLM” se utilizó para obtener valores de error estándar no escalados normalizados (valores NUSE) para cada colección de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda en la misma.

Para medir la expresión génica de forma precisa y fiable, es importante tener en cuenta la variabilidad experimental (debida a las muestras) y sistemática (debida al procesado) que puede asociarse a un experimento de estas características. El término normalización hace referencia al proceso llevado a cabo para minimizar los efectos de dicha variación sobre el análisis. De esta manera pueden distinguirse más fácilmente las diferencias biológicas, y al mismo tiempo, permite la comparación de los niveles de expresión en el conjunto de las matrices estudiadas. Los valores de intensidad de cada sonda se procesaron y normalizaron por el método Robust Multichip Average (RMA) para obtener un valor de intensidad individual para cada grupo de sondas. Los datos de los GeneChips fueron filtrados para eliminar las secuencias control (62) y aquellas secuencias con señal de hibridación cercana al fondo (“background”).

Se llevó a cabo un paso de normalización por cuantiles, utilizando para ello el programa de análisis Partek Genomics Suite v7.3.1. Por último, la lista de secuencias se filtró para eliminar aquellas sondas que no presentasen ningún cambio de expresión en todas las muestras, basándose en la desviación estándar de los datos de intensidad normalizados. El valor utilizado como límite de cambio de expresión entre condiciones permite eliminar secuencias que no varían en la comparación entre cualquier muestra del experimento y que por lo tanto no son informativas.

B. Análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística de reducción de la dimensión de los datos (en este caso los valores de expresión de cada sonda). El objetivo principal es la representación de las medidas numéricas de las sondas en un espacio de pocas dimensiones donde nuestros sentidos puedan percibir relaciones que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. Dicha representación debe ser tal que al desechar dimensiones superiores la pérdida de información sea mínima. La elección de los factores o componentes se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original presente en el experimento. El segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. El número de factores o componentes principales que se toma por defecto es de 3 y con él se explicará un porcentaje de la varianza existente especificado en el gráfico. La imagen resultante se compara con los factores experimentales conocidos con el fin de asociar la variabilidad observada (o lo que es lo mismo, diferencias) a alguno de ellos. El *software* permite colorear las muestras en función de distintos factores.

Un árbol jerárquico es un método estadístico que permite la clasificación de objetos, en este caso perfiles de expresión de genes o muestras en grupos o “clústeres” por similitud entre ellos. Para ello, se calcula la distancia de cada gen con todos los demás y se agrupan los dos genes que presenten una correlación más alta. A continuación se calcula la media del perfil de expresión de esos dos y con este gen o muestra “sintético” se repite el cálculo de la distancia para todos los demás objetos. Este proceso se repite hasta que todos los genes o muestras han sido agrupados por parejas. Posteriormente, se calculan los cocientes de separación y la medida de similitud que organizarán el árbol formando grupos discretos y ramificaciones, respectivamente. Para realizar los agrupamientos jerárquicos se utilizó el *software* Partek Genomics Suite, aplicando como medida de similitud la distancia euclídea y como método de agrupación el *average linkage*.

#	Gene Symbol	Gene Title	Function	p-value	Fold Change
1	WARS2	tryptophanyl tRNA synthetase 2, mitochondrial	Vascular development	0.015	1.52
2	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	Gluc uptake / Apoptosis/ Proliferation	0.022	1.52
3	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase	Cell adhesion / Cytoskeleton	0.007	1.52
4	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1	Ion transport / Cytoskeleton	0.012	1.54
5	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	Cell adhesion	0.007	1.55
6	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	Vascular development / Differentiation	0.005	1.55
7	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	Actin filaments dynamics	0.014	1.57
8	KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	Oxidative stress response	0.000	1.57
9	SLC2A12	solute carrier family 2 member 12	Glucose transport	0.008	1.58
10	PGM2L1	phosphoglucosmutase 2-like 1	Glucose synthesis	0.002	1.63
11	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	PI3K signalling pathway	0.009	1.64
12	SHROOM3	shroom family member 3	Cytoskeleton dynamics / Cell adhesion	0.030	1.65
13	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	Cell adhesion / Cytoskeleton	0.014	1.65
14	REEP3	receptor accessory protein 3	Cell receptor	0.033	1.69
15	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	Extracellular matrix (ECM)	0.004	1.75
16	ITGB8	integrin, beta 8	Cell adhesion	0.034	1.75
17	MAP1B	microtubule-associated protein 1B	Microtubule assembly	0.006	1.75
18	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	Notch signalling	0.017	1.76
19	PHLDB2	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2	PI3K signalling pathway	0.017	1.76
20	CD24	CD24 molecule	Cell dissemination	0.006	1.80
21	MATN2	matrilin 2	ECM	0.026	1.83
22	NAV3	neuron navigator 3	Filaments dynamics	0.002	1.95
23	XAF1	XIAP associated factor-1	Apoptosis	0.043	1.97
24	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	Cytoskeleton dynamics	0.003	2.11
25	EHF	ets homologous factor	Differentiation and proliferation	0.043	2.25
26	AOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	Growth and cell cycle control	0.014	4.30
#	Gene Symbol	Gene Title	Function	p-value	Fold Change
1	UTRN	utrophin	Cell adhesion	0.042	-2.90
2	NDUFA4L2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	OXPHOS	0.015	-1.87
3	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Vascular development	0.017	-1.82
4	HAS3	hyaluronan synthase 3	ECM / Tumor development	0.012	-1.73
5	CA9	carbonic anhydrase IX	Cell proliferation and transformation	0.006	-1.70
6	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	Cell growth and death	0.011	-1.63
7	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	Apoptosis	0.035	-1.62
8	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	Nucleotide biosynthesis	0.025	-1.57
9	MAG1	lung cancer metastasis-associated protein	Fatty acid synthesis	0.029	-1.54
10	JMJD6	jumonji domain containing 6	Vascular development	0.017	-1.51
11	NFIA	nuclear factor I/A	Transcription factor	0.016	-1.51
12	RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	Cell differentiation and transformation	0.019	-1.50

Tabla A1. Secuencias diferencialmente expresadas entre tumores M y G. La tabla resume la lista de las secuencias que se encuentran sobreexpresadas o reprimidas de forma más significativa en tumores G cuando se comparan frente a tumores M. *Gene symbol*, símbolo del gen; *gene title*, nombre de la proteína que codifica; *function*, función más relevante en la que participa cada gen en el contexto celular; *p-value*, el p-valor cuando se aplica el test; *fold change*, el valor de cambio en la expresión.

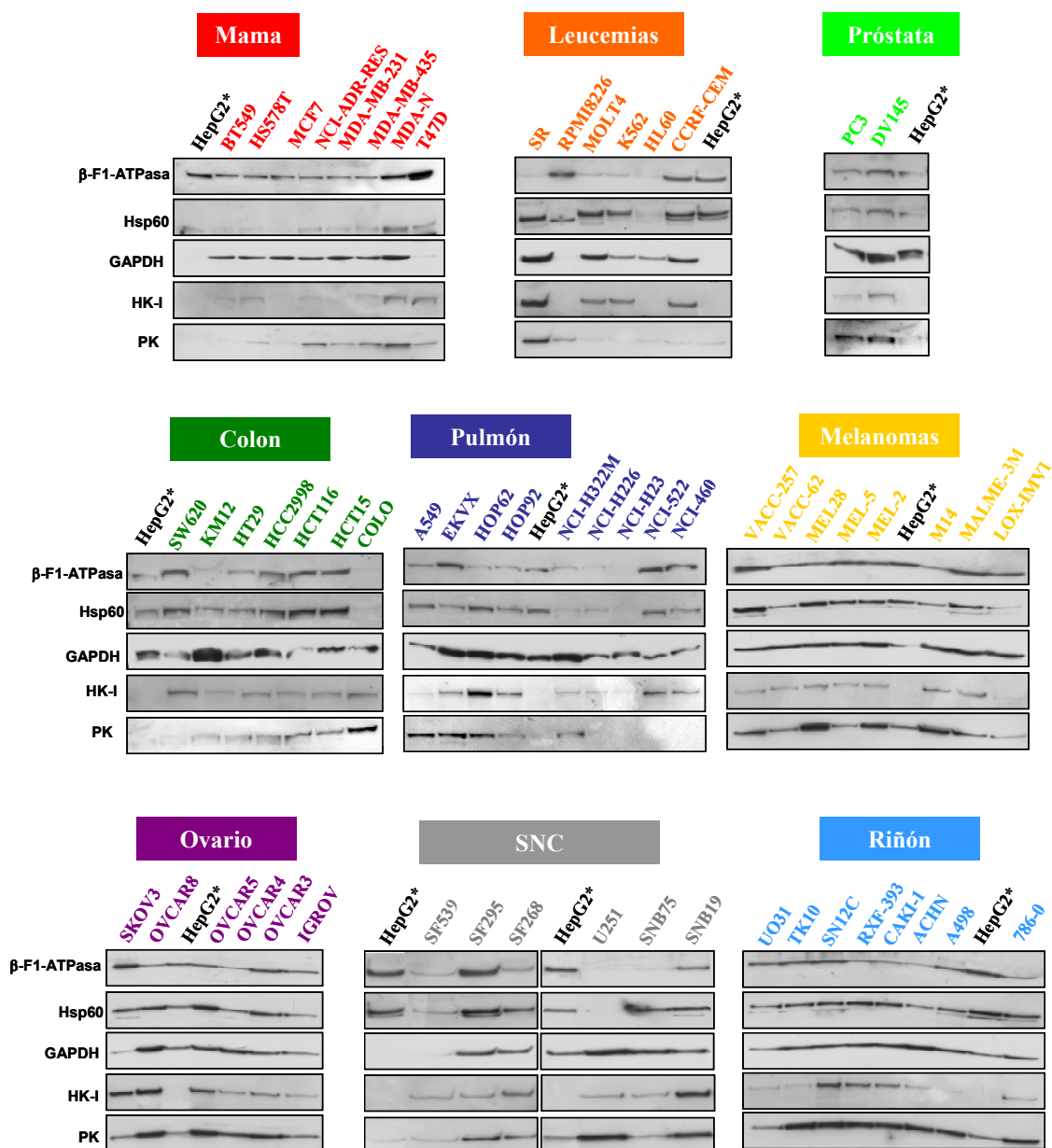


Figura A1. Expresión de los marcadores del metabolismo energético en el panel del NCI-60. Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas β-F1-ATPasa, Hsp60, GAPDH, hexoquinasa I (HK-I) y piruvato quinasa (PK) en muestras de proteína (10µg) de las distintas líneas celulares que componen el panel del NCI-60. La línea celular HepG2 (*) se incluyó en cada gel como control interno para normalizar la expresión de los marcadores en las distintas líneas celulares.

ANEXO II

Selection of cancer cells with repressed mitochondrial biogenesis marks the onset of colon cancer progression.

María Sánchez-Aragó¹, Margarita Chamorro¹ and José M. Cuezva^{1,2}.

¹, Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras CIBERER-ISCI, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

², Author to whom correspondence should be addressed:

Prof. José M. Cuezva,
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,
Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.
Phone: 34 91 196 4618; Fax: 34 91 196 4420;
E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es

Running Title: Repression of mitochondria in cancer.

Summary

The role of mitochondrial function in cancer biology is debated. Here, we have studied the role that mitochondrial structure and function have in colon cancer progression. We show that the activity of oxidative phosphorylation defines the rate of glucose utilization by aerobic glycolysis, sustaining the relevance of the Pasteur Effect in cancer biology. Tumor promotion inevitably requires the selection of cancer cells with a repressed biogenesis and functional activity of mitochondria. This trait provides the cancer cell with a cell-death resistant phenotype because it obliterates the potential for mitochondrial ROS (reactive oxygen species) signaling. Pharmacological reversion of the cancer cell to a mitochondrial-dependent phenotype is an effective strategy against colon cancer, strongly supporting that mitochondrial activity is a tumor suppressor.

Significance

In recent years, energetic metabolism has become a central issue of investigation in cancer biology triggering a renaissance of the role of mitochondria in the field. Energy provision by oxidative phosphorylation and the execution of cell-death are two mitochondrial activities that are molecularly and functionally integrated. Despite this link, the contribution of energetic metabolism to cancer progression is still a matter of debate. Herein, we show that progression of colon tumors inevitably requires the repression of mitochondrial biogenesis and function. The good news is that the aggressive metabolic phenotype competent for cancer progression is a trait that could be reverted by the stimulation of the metabolic activity of mitochondria both in cancer cells and tumors.

Introduction

Mitochondria play a central role in the homeostasis of higher eukaryotic cells. The biogenesis of mitochondria is a complex genetic program that requires the concerted expression of two physically separated genomes (Scarpulla, 2008). Regulation of mitochondrial biogenesis is exerted at the level of transcription in the nucleus and by replication and transcription in the mitochondrial genome (Scarpulla, 2008). Nevertheless, mechanisms that control the localization, stability and translation of nuclear and mitochondrial encoded mRNAs also define the mitochondrial phenotype of the cell (Izquierdo and Cuezva, 1997; Lithgow et al., 1997).

The provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation, the execution of cell death and intracellular signaling by Ca^{2+} and reactive oxygen species are main cellular functions of mitochondria. In oxidative phosphorylation, ATP is synthesized from ADP and Pi by the mitochondrial H^+ -ATP synthase, a rotatory engine complex of the inner mitochondrial membrane that utilizes as driving force the proton electrochemical gradient generated by the respiratory chain (Boyer, 1997). Mitochondria, in response to different types of stimuli (death signaling, deprivation of trophic factors, DNA damage, ischemia, chemical or metabolic stress) release proteins that regulate different cell death pathways (Ferri and Kroemer, 2001; Jaattela, 2004). Bioenergetics and the execution of cell death by the mitochondrial geared pathway are activities that are molecularly and functionally integrated (Danial et al., 2003; Liu et al., 1996; Santamaria et al., 2006; Vahsen et al., 2004). The requirement of oxidative phosphorylation for efficient execution of cell death is nowadays quite firmly established (Dey and Moraes, 2000; Kim et al., 2002; Matsuyama et al., 1998; Park et al., 2004; Santamaria et al., 2006; Tomiyama et al., 2006). In this regard, cells that are unable to carry on oxidative phosphorylation and rely heavily on glycolysis have an apoptotic-resistant phenotype (Dey and Moraes, 2000; Kim et al., 2002; Park et al., 2004; Santamaria et al., 2006). Likewise, the treatment of cells with specific inhibitors of the H^+ -ATP synthase, inhibit and/or delay the execution of cell death (Matsuyama et al., 1998; Santamaria et al., 2006). In addition, the activity of oxidative phosphorylation has been shown to be required for Bax-induced toxicity in yeast cells

(Harris et al., 2000). Moreover, genetic screens aimed at the identification of genes that could confer a Bax-resistance phenotype, identified a subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase critical for Bax-mediated killing of *S. cerevisiae* (Matsuyama et al., 1998). Moreover, Bax-mediated killing in yeast is strictly dependent upon select mitochondrial components such as the nuclear encoded β -subunit of the H⁺-ATP synthase (β -F1-ATPase) and mitochondrial genome-encoded proteins (Gross et al., 2000). Recent findings support that the contribution of the H⁺-ATP synthase to the execution of cell death is exerted by controlling the production of ROS generated by the respiratory chain (Santamaria et al., 2006). The generated ROS have been shown to promote oxidative damage to mitochondrial constituents and to favor the release of proteins from mitochondria facilitating the execution of cell death (Santamaria et al., 2006).

The energetic metabolism of the cancer cell has raised renewed clinical and biotechnological interests (Cuezva et al., 2009; DeBerardinis et al., 2008; Frezza and Gottlieb, 2009; Garber, 2006). In this regard, it has been consistently reported that the relative cellular expression level of the bottleneck β -F1-ATPase protein of oxidative phosphorylation is significantly diminished in tumors when compared to its levels in normal tissues (Acebo et al., 2009; Cuezva et al., 2004; Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2005; Lin et al., 2008). In certain types of carcinomas the down-regulation of β -F1-ATPase is accompanied by an increased expression of some of the markers of the glycolytic pathway (Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2005). This proteomic feature of cancer, that is fulfilled by more than 95% of the carcinomas analyzed in large cohorts of different tumors (Cuezva et al., 2004; Isidoro et al., 2005), defines a “bioenergetic signature” of potential clinical value as an indicator of disease progression in colon (Cuezva et al., 2002; Lin et al., 2008), lung (Cuezva et al., 2004; Lopez-Rios et al., 2007) and breast (Isidoro et al., 2005) cancer patients as well as a potential predictive marker of the cellular response to chemotherapy (Lin et al., 2008; Santamaria et al., 2006; Shin et al., 2005). Moreover, the “bioenergetic signature” of tumors also informs of the rates of glucose uptake (Lopez-Rios et al., 2007), adding further functional value to this proteomic index and strongly supporting a relevant role for the mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer progression.

The suppression of the tissue-specific differences in the expression of the markers of energetic metabolism and the drastic reduction of the bioenergetic signature of the tumors (Acebo et al., 2009) strongly support that containment of the mitochondrial bioenergetic activity in the cancer cell is an event required for tumor progression. Indeed, tumors with a low bioenergetic signature have a worse prognosis (Cuezva et al., 2004; Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2005; Lin et al., 2008; Lopez-Rios et al., 2007). In this study we have addressed the role that the molecular and functional activity of mitochondria has in colon cancer progression. We show that for successful *in vivo* tumor growth only cells with a repressed biogenesis of mitochondria and an enforced glycolysis are selected. This cellular phenotype confers resistance to cell death and contributes to the rapid accretion of tumor mass. However, it also embodies the Achilles' heel of cancer and a most promising target to halt disease progression because it represents a reversible trait of the malignant phenotype that is amenable to treatment.

Results

Regulating the mitochondrial phenotype of colon cancer HCT116 cells. Treatment of HCT116 cells with oligomycin (OL), a specific inhibitor of the mitochondrial H⁺-ATP synthase, resulted in cells with down-regulated expression of its catalytic β -F1-ATPase subunit (G vs M cells in Figure 1A). Conversely, treatment of HCT116 cells with 2-deoxyglucose (2-DG), an inhibitor of glycolysis, resulted in cells displaying up-regulated expression of β -F1-ATPase (SM vs M cells in Figure 1A). Changes in the expression of β -F1-ATPase in OL (G) and 2-DG (SM) treated cells occurred in the absence of relevant changes in the expression of the structural mitochondrial protein Hsp 60 and of the marker of glycolysis glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Figure 1A), so that the β -F1-ATPase/GAPDH (bioenergetic signature) and β -F1-ATPase/Hsp 60 ratios were significantly diminished in OL-treated cells and augmented in 2-DG treated cells respectively, when compared to non-treated M-type HCT116 cells (Figure 1A).

The changes promoted in the expression of β -F1-ATPase in HCT116 cells after OL and 2-DG treatments were also manifested at the subcellular level by large ultrastructural modifications of mitochondria in the absence of significant changes in the number of organelles per cell (16.3 ± 1.8 organelles/cell section) (Figure 1B). Cells with the G-phenotype were mostly populated with mitochondria devoid of cristae (Figure 1B) whereas M- and SM-cells contained mitochondria with developed cristae (Figure 1B). The relative cristae length in the mitochondria of G-, M- and SM-cells revealed a significant increase as a function of the expression of β -F1-ATPase (Figure 1C). Moreover, a higher relative electron density of the matrix of SM- and M-type mitochondria was observed when compared to G-type cells (Figure 1C), suggesting a higher protein complement of the mitochondria in these cells.

Aerobic glycolysis was found to increase as the relative expression of β -F1-ATPase (β -F1/GAPDH ratio) diminished in the cells (Figure 1D), showing these parameters a significant inverse relationship ($R = -0.676$; $P < 0.01$; $n = 28$). No changes in basal and maximum (FCCP-(carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazine) induced) oxygen consumption rates were observed between non-treated and OL or 2-DG treated cells

(data not shown). However, consistent with the role played by β -F1-ATPase as bottleneck of mitochondrial oxidative phosphorylation G-cells had an irrelevant oligomycin sensitive respiration when compared to M- and SM-cells (Figure 1E). Likewise, a significant direct relationship between the relative expression level of β -F1-ATPase (β -F1-ATPase/GAPDH ratio) and the rates of oligomycin sensitive respiration was also noted ($R= 0.534$; $P<0.05$; $n= 21$). Consistently, a significant inverse correlation between the activity of oxidative phosphorylation and the rates of glucose consumption by aerobic glycolysis existed (Figure 1F) ($R= - 0.50$; $P<0.05$; $n= 22$), strongly supporting the role of mitochondrial activity in glucose utilization rates by cancer cells. Overall, these findings indicate that the expression level of β -F1-ATPase has a profound effect on the structure and function of mitochondria in cancer cells with further consequences in the cellular metabolism of glucose. For this reason, OL-treated cells, which exhibit mitochondria with few cristae, low β -F1-ATPase expression, a blunted oxidative phosphorylation and an enforced aerobic glycolysis (Figure 1), were defined as cells with a Glycolytic-phenotype (G-type). On the contrary, 2-DG treated cells, which exhibit high β -F1-ATPase expression, mitochondria with developed cristae and displayed low rates of aerobic glycolysis and a significant activity of oxidative phosphorylation (Figure 1) were defined as cells with the Super-Mitochondria-phenotype (SM cells). Control, non-treated HCT116 cells, with a phenotype intermediate between the G- and SM-cells were defined as those with the Mitochondrial-phenotype (M cells).

G-cells have a higher rate of tumor-growth “in vivo”. No differences were observed in the proliferation rates of SM-, M- and G-cells when growing in culture as assessed both by cellular proliferation assays (Figure 2A) and by the analysis of the cell cycle (data not shown), indicating that cellular bioenergetics is not influencing the rate of proliferation and accretion of HCT116 cells in culture. However, when cells with M-, G- and SM-phenotypes were implanted into the right flank of nude mice to promote tumor development, we observed that the bioenergetic phenotype significantly affected the rate of tumor development *in vivo* (Figure 2B). Tumors appeared under the three conditions tested (Figure 2B). However, tumors in the mice implanted with G-cells grew significantly faster than those developed from M- and SM-cells (Figure 2B). Since no significant differences

were observed in tumor growth for animals implanted with cells with the M- and SM-phenotypes (Figure 2B) in survival analysis the mice allocated in these two groups were analyzed together (Figure 2C) and compared with the G group of animals. The results revealed a significant difference ($P=0.004$) in survival (Figure 2C) strongly indicating that *in vivo* a compromised mitochondrial activity and an enforced glycolysis affords a phenotypic advantage for colon cancer progression.

The bioenergetic phenotype influences the cellular response to death. Cell death is modulated by the bioenergetic phenotype (Dey and Moraes, 2000; Matsuyama et al., 1998; Santamaria et al., 2006; Shin et al., 2005; Tomiyama et al., 2006) and it might contribute *in vivo* to the observed differences in the rates of tumor growth (Figure 2B). Analysis of the cell-death response to 5-fluorouracil (5-FU) in SM-, M- and G-type HCT116 cells, revealed a significant direct correlation between the activity of oxidative phosphorylation and the extent of 5-FU-induced cell death ($R= 0.766$; $P<0.01$; $n= 24$) (Figure 2D). In agreement with previous results in colon cancer cells (Shin et al., 2005), the higher the bioenergetic phenotype of the cell ($SM > M > G$) the highest is its cell death-response ($SM > M > G$) to the death inducing agent (Figure 2D). Moreover, and consistent with previous findings (Santamaria et al., 2006) the bioenergetic phenotype of HCT116 cells markedly influenced the ROS production response after treatment of the cells with 5-FU (Figure 2E). These results suggested that a faster rate of tumor accretion in G-implanted mice could result from the cell-death resistant phenotype of this cellular type.

Gene expression profiles of the G- and M-phenotypes. To further characterize the molecular basis that might underlie the aggressive G-phenotype of HCT116 cells, we analyzed the comprehensive gene expression profiles of M- and G-cells using the Human Genome U133 Plus 2.0 array following Affymetrix technology. Bioinformatic analysis revealed that 4,519 probe sets, representing 3,430 genes of the GO database were differentially expressed ($p<0.05$, Partek software analysis) between both cell types (Table S1 in supplementary material). Hierarchical clustering analysis using the genes differentially expressed illustrated the existence of large differences between M- and G-type cells (Figure 3A). From the global list of significant genes (see Table S1 in supplementary

material), 368 genes were ascribed to specific Kegg Pathways (Figure 3B). Moreover, discrimination of the M- and G-phenotypes was accomplished by 2,387 genes significantly associated with RNA processing, metabolic processes (TCA cycle, glucose), regulation of the cell cycle, apoptosis, cell differentiation, mitochondrial biogenesis, cell adhesion and vascular development as the most relevant biological processes (Figure 3C). Table 1 provides a summary of some relevant genes found differentially expressed between M- and G-cells. In the G-phenotype it was observed the up-regulation of genes required for iron transport, vascular development, protein synthesis and degradation, nucleotide metabolism, oncogenes, regulators of cell cycle progression, the metabolism of amino acids and of the pentose phosphate pathway (Table 1). Moreover, G-cells showed the down-regulation of genes involved in Wnt/Ca²⁺ signaling pathways and the regulation of cytoskeleton dynamics (Table 1).

Remarkably, gene expression analysis revealed that the aggressive G-phenotype is associated with the repression of genes involved in mitochondrial biogenesis and function and more specifically of oxidative phosphorylation. For instance, it was observed that from a total of 369 genes related with mitochondrial functions, 297 were significantly inhibited in G-cells (80% of the genes) when compared to M-cells (Figure 3D). The histograms in Figure 3E summarize the validation by qPCR of the changes observed in gene expression between G- and M-cells for 25 representative genes that participate in DNA expression and repair, biosynthesis of precursors, vascular development, oxidative phosphorylation, mitochondrial metabolism and apoptosis and mitochondrial biogenesis confirming array data (see Table 1 and text in supplementary material).

In vivo tumor progression selects cells with the G-phenotype. Remarkably, analysis of the expression of markers of the “bioenergetic signature” in the tumors derived from the implanted G-, M-, and SM-cells revealed that the expression of β -F1-ATPase, Hsp 60 and GAPDH was the same irrespective of the phenotype of the cells implanted (Figure 4A). In fact, the normalized expressions of β -F1-ATPase revealed that all tumors had the mitochondrial phenotype of G-cells (Figure 4A).

The gene expression profile of solid tumors derived from M- (AT-M) and G- (AT-

G) cells was compared using the Human Genome Plus 2.0 array. In high contrast with the analysis of gene expression in the parental cells (Figure 3 and Table 1) tests for multiple correction (FDR and Bonferroni) revealed the absence of differences in gene expression between AT-M and AT-G tumors (Table S2 in supplementary material). These results indicate that AT-M and AT-G tumors essentially have the same transcriptome. In fact, most of the genes found significantly up- or down-regulated in the analysis of M- vs G-cells (summarized in Table 1 and Figure 3) were not found altered in the analysis of the corresponding tumors (see Table S2 in supplementary material), reinforcing the molecular resemblance between AT-M and AT-G tumors. Real time qPCR analysis of a fraction of the genes found differentially expressed between the M- vs G-type cells in samples derived from AT-M and AT-G tumors confirmed the transcriptomic identity of AT-M and AT-G tumors (Figure 4B).

Moreover, electron microscopy analysis of the tumors derived from G- (AT-G), M- (AT-M) and SM- (AT-SM) cells confirmed that mitochondria in the all type of tumors were mostly devoid of cristae resembling the mitochondrial ultrastructure found in G-cells (Figure 4C). Overall, these results strongly support that tumors develop in mice only after cells with a G-phenotype have been selected.

The G-phenotype is a reversible acquired trait. The transformation of M- and SM-cells into the aggressive G-phenotype when growing *in vivo* suggests that the acquisition of this phenotype is not responding to a permanent cellular transformation event but rather results from metabolic adaptation of the cancer cell to a particular “*milieu*”. To verify the reversibility of the metabolic phenotype, G- and SM-type cells were cultured for various days after removing their respective drug treatments and their phenotypes analyzed (Figure 5). Both in washed SM- and G-cells, the rates of aerobic glycolysis (Figure 5A) and the activity of oxidative phosphorylation (data not shown) returned to the values observed in the parental M-cells. Consistent with these changes the bioenergetic signature of washed SM-cells showed a sharp decrease (Figure 5B) whereas a significant increase was observed in the bioenergetic signature of washed G-cells (Figure 5B).

Short-term treatment of G-cells with 10 mM dichloroacetate (DCA), an activator of

the mitochondrial decarboxylation of pyruvate (Bonnet et al., 2007; McFate et al., 2008) promoted the down-regulation of the rates of aerobic glycolysis to levels not significantly different from those found in cells with the M-phenotype (Figure 5C). Moreover, electron microscopy analysis of DCA-treated cells revealed that mitochondrial ultrastructure was partially restored resembling the organelles in M-cells (Figure 5D) as a result of a significant increase of both the relative cristae length and electron density of the matrix (Figure 5E). DCA treatment promoted the arrest of cellular proliferation (Figure 5F) indicating that in addition to the metabolic effect of DCA on mitochondria, the compound is also affecting cellular growth. In any case, and to explore its effect *in vivo*, G-cells were implanted in nude mice for studying the tumor-growth inhibitory activity of DCA (Figure 5G). A control NaCl-treated group and a group treated with 5-FU (a conventional chemotherapeutic treatment for colon cancer), were also included for comparison (Figure 5G). Daily treatment of the animals with the different agents was initiated after the mice had developed tumors of $\sim 1\text{cm}^3$ and lasted for six consecutive days (Figure 5G). Control NaCl-treated animals revealed a rapid 2.5 fold increase in tumor volume after six days of initiating the treatments (Figure 5G). In contrast, animals treated with 5-FU revealed a significant decrease in tumor volume after 6d of treatment (Figure 5G). The maximum tumor-growth reduction ($> 50\%$) was attained in mice treated with DCA (Figure 5G) indicating that reversion of the metabolic phenotype of the cancer cell to a mitochondrial dependent pathway promotes *in vivo* tumor regression.

Discussion

The number of mitochondria, its molecular composition and functional relevance vary from one tissue to another (Pagliarini et al., 2008). Moreover, it has been documented that in cells growing in culture the ultrastructure and molecular composition of mitochondria varies depending upon changes in the availability of substrates for energy metabolism (Rossignol et al., 2004). Here, we have examined the role that mitochondrial energetic metabolism has in colon cancer progression. To this aim, we have generated and characterized two colon cancer cell lines derived from the human HCT116 colocal carcinoma that exhibit large structural, molecular and functional differences in their mitochondrial phenotype as a result of the variable expression of β -F1-ATPase. We show that tumor promotion *in vivo* inevitably requires the selection of cancer cells with a repressed mitochondrial phenotype that shifts the energetic metabolism to depend heavily on aerobic glycolysis. The findings indicate that repression of organelle biogenesis, specifically of the bioenergetic differentiation of mitochondria, is a prerequisite for colon cancer progression. Repression of mitochondrial biogenesis ensue cancer cells with an apoptotic resistant phenotype that might contribute to the accretion of tumor mass. The acquisition of this metabolic trait is a reversible feature imposed by the *milieu* where tumor cells develop *in vivo* and, in agreement with this, pharmacological reversion of the metabolic trait of cancer cells halts tumor progression.

It has been shown that the H^+ -ATP synthase is a key organizer of the inner mitochondrial membrane as well as a regulator of cristae formation both in yeast (Goyon et al., 2008; Paumard et al., 2002; Strauss et al., 2008) and in cells of mammals (Giraud et al., 2002; Minauro-Sanmiguel et al., 2005). Consistently, we show that cells with different content of the catalytic β -F1-ATPase subunit of the H^+ -ATP synthase have large ultrastructural modifications of mitochondria. Changes in the cellular expression of this protein could result from changes in the number of mitochondria per cell and/or from the degree of the bioenergetic differentiation of the mitochondrion (Cuezva et al., 1997). The lack of changes in the expression of the structural Hsp 60 together with the profound ultrastructural alterations observed in mitochondria as the expression of β -F1-ATPase augments strongly support that the treatments are specifically affecting the differentiation

of the organelle (Cuezva et al., 1997; Valcarce et al., 1988). In line with this suggestion we observed no relevant changes in the number of mitochondria/cell in any of the cell types studied. Remarkably, mitochondria in G-cells strongly resembled the phenotype of liver organelles during fetal stages of development (Cuezva et al., 1997; Valcarce et al., 1988) suggesting that this phenotype might result from retrograde des-differentiation of the organelle, a mitochondrial *déjà vu* of early embryonic stages, as a result of the repression of β -F1-ATPase expression ((Cuezva et al., 1997), see below).

The bioenergetic differentiation of mitochondria during liver development affords a paradigm of organelle biogenesis controlled by translational activation of the mRNAs required for mitochondrial function, specifically affecting the β -subunit of the H^+ -ATP synthase (Izquierdo and Cuezva, 1997; Izquierdo et al., 1995). The mechanisms triggering the rapid translation unmasking of the nuclear and mitochondrial encoded mRNAs required in this situation have been partially characterized (Cuezva et al., 2007). Moreover, it has been documented the re-installment of the same program for the retrograde des-differentiation of mitochondria during liver oncogenesis (de Heredia et al., 2000). We propose that the reversible changes documented in this study in the bioenergetic phenotype of the mitochondria as a result of interfering with oxidative phosphorylation (OL) or with glycolysis (2DG; DCA) mechanistically resemble mitochondrial responses upon changes in the availability of energetic substrates (Rossignol et al., 2004), what suggests the implication of the AMP kinase (AMPK) signaling pathway in the adjustment of the final mitochondrial phenotype of the cell (Canto et al., 2009). Overall, these studies reinforce the relevance that the program of mitochondrial differentiation has in human pathophysiology.

The molecular, structural and functional changes introduced in mitochondria by OL, 2DG and DCA treatments are consistently paralleled by profound modifications in the activity of the pathways that define the energetic metabolism of the cancer cell. Remarkably, we document for the first time in cells of mammals the existence of an inverse relationship between the activity of mitochondrial oxidative phosphorylation and the rates of glucose utilization by aerobic glycolysis. A previous report showed the correlation existing between the proteomic index that informs of the bioenergetic signature with both the rates of *in vivo*

glucose uptake by tumors and with the rates of aerobic glycolysis in cancer cells (Lopez-Rios et al., 2007). Altogether, these results strongly support that the bioenergetic activity of mitochondria defines the rates of glucose capture and utilization by cells and tumors, thus sustaining the relevance of the Pasteur Effect in cancer biology as originally put forward by O. Warburg many years ago (for review see (Warburg, 1966))

The onset of tumor growth is a poorly understood step of carcinogenesis. Many studies have analyzed the gene expression signatures of cancer cells and tumors with the specific aim of unveiling the molecular events that define the progression of specific neoplasias (Hoek et al., 2004; Yao et al., 2006). Consistent with these studies our findings illustrate that the acquisition of the aggressive G-phenotype in colon cancer is bound to the deregulated expression of genes involved in angiogenesis and vascular development, cellular proliferation, apoptosis, cell adhesion and cytoskeleton reorganization. In this regard, it is relevant the high and significant induction observed in G-cells of the lipocalin 2 gene. Recent findings have shown that lipocalin 2 triggers an epithelial to mesenchymal transition and significantly increase cell motility and invasiveness in breast cancer (Yang et al., 2009). Several metabolic pathways related with the turnover of proteins and RNA metabolism as well as with the generation of NADPH required for biosynthetic processes are stimulated in G-cells when compared to the non-aggressive M-phenotype of cells. Remarkably, relevant mitochondrial functions involved in the provision of metabolic energy, such as the oxidation of pyruvate and amino acids, the functioning of the TCA cycle and oxidative phosphorylation as well as the biogenesis of mitochondria itself are repressed in G-cells in agreement with molecular, functional and structural data. These results therefore provide the first molecular and functional evidence that *in vivo* tumor progression requires the acquisition of a cellular phenotype with a repressed biogenesis and functional activity of mitochondria. In line with these findings it has been reported that the induction of glycolytic genes and the repression of genes involved in the TCA cycle represent the striking difference between *in vitro* and *in vivo* growth of cancer cells (Funes et al., 2007).

Selection of the G-phenotype could initially respond to an increased demand of

carbon skeletons to support the accretion of cellular constituents required for proliferation. However, this possibility seems unlikely because the three cell lines revealed no differences in their rates of cellular proliferation when growing in culture despite large differences in their rates of glycolysis. As recently suggested (Fang et al., 2008) selection of the high glycolytic phenotype *in vivo* must provide cells with an advantage for tumor progression related with facilitating the adaptation of the cells to a hypoxic and/or an acidic environment. Moreover, this selection could also contribute to the acquisition of a cell death resistant phenotype. Indeed, energetic metabolism and the execution of cell death are two mitochondrial activities that are molecularly and functionally integrated, being the H⁺-ATP synthase an additional component involved in both pathways (Dey and Moraes, 2000; Gross et al., 2000; Harris et al., 2000; Kim et al., 2002; Matsuyama et al., 1998; Park et al., 2004; Santamaria et al., 2006; Tomiyama et al., 2006). In agreement with these suggestions, we show that G-cells have deregulated expression of several genes involved in adaptation to hypoxia and with the execution of cell death, being the latter activity significantly diminished in G-cells in response to 5-FU. Deregulated cell death in G-cells in response to 5-FU seems to result from diminished ROS signaling, also consistent with the recent redox-protective role exerted by glucose metabolism in cancer cells (Vaughn and Deshmukh, 2008).

Most important for understanding cancer progression and its treatment is that the tumor forming G-phenotype is acquired independently of any genetic alteration being a reversible trait that could be modulated by agents that regulate the bioenergetic differentiation of mitochondria. It has been documented that interference of the mitochondrial oxidation of pyruvate predisposes to tumor development (Thierbach et al., 2005) and cellular invasion (Amuthan et al., 2001). Conversely, the activation of mitochondrial function by restoring the oxidation of pyruvate (Bonnet et al., 2007; Hervouet et al., 2005; McFate et al., 2008) or by suppression of its glycolytic metabolism (Fantin et al., 2006) compromise the ability of cancer cells to proliferate. Overall, these findings reinforce the idea of a tumor suppressor function of mitochondrial activity (Cuezva et al., 2009; Jones and Thompson, 2009) and place the repression of mitochondrial biogenesis as part of the *in vivo* program required for tumor progression.

Various signaling pathways have been implicated in the cell-type specific regulation of the biogenesis of mitochondria in response to different stimuli (Scarpulla, 2008; Spiegelman, 2007; Wu et al., 2002). Ultimately, signaling pathways convey its messages to key downstream transcriptional activators (NRF-1, NRF-2, CREB,) and co-activators (PGC-1 α , PGC-1 β , PRC-1,...) that orchestrate the concerted transcriptional response of the nuclear genes encoding mitochondrial proteins as well as of the transcription (TFAM, mtTFBs) and termination (mTERF) factors required for the correct expression of the mitochondrial genome (Scarpulla, 2008). Gene expression analysis showed no relevant changes in the expression of NRF1, PGC1 α and PRC between M- and G-type cells (Table S1). However, it revealed that NRF-2, CREB as well as the genes involved in the expression of the mitochondrial genome TFAM, TFB2A and mTERF were significantly down-regulated in G-type cells (Table S1 and Figure 3) consistent with the observed repression of mitochondria in these cells. Little is known about the signaling pathways that repress the biogenesis of mitochondria. In this regard, the stress-responsive transcription factor DDIT3 (also known as CHOP) and its target gene TRIB3 might deserve special attention (Zhao et al., 2002). A very recent gene expression profiling analysis after the inhibition of mitochondrial respiratory function in mouse epithelial cells has also observed the up-regulation of DDIT3 and TRIB3 in addition to other genes found up-regulated in our study (GADD45A, BNIP3 and Nt5e) (Ishikawa et al., 2009). It is likely that the over-expression of DDIT3 in G-cells might contribute to the down-regulation of the biogenesis of mitochondria through its repressor activity on c/EBP, which is known to be required for the biogenesis of mitochondria (Carmona et al., 2002; Chiu et al., 2004). Likewise, the expression of FOS and JUN, major components of the AP1 transcription factor complex which is also required for efficient biogenesis of mitochondria (Xia et al., 1997), are also significantly diminished in G-cells (Table S1; Figure 3). Moreover, FOS activity is likely to be antagonized by the high expression level of the DDIT3-regulated stress-responsive serine/threonine protein kinase TRIB3, which has been shown to inhibit AP1 activity in HeLa cells (Kiss-Toth et al., 2004).

We have recently reported that cancer abolishes the cell-type specific differences in

energetic metabolism (Acebo et al., 2009) strongly supporting its use as a common generic target to combat different types of neoplasias. In agreement with recent findings (Bonnet et al., 2007; Wong et al., 2008) we observed that DCA promoted the regression of colon tumors as effectively as the conventional treatment with 5-FU. However, and in contrast to findings in lung (Bonnet et al., 2007), prostate (Cao et al., 2008) and endometrial (Wong et al., 2008) cancer cells, we observed that DCA induces a marginal apoptotic response in colon cancer cells in culture when compared to 5-FU (data not shown). Therefore, tumor regression induced by DCA treatment should be mechanistically ascribed to the arrest of cellular proliferation, as we have observed after treatment of the cells with this agent, together with the induction of some form of cell death (apoptotic and/or necrotic) triggered by DCA in the environment where the tumors develop in the mouse model. Indeed, cells with functional mitochondria that lacked an enforced glycolysis (M- and SM-cells) are unable to promote tumor development. Moreover, no tumors were recovered with the M- or SM-phenotype indicating its disability to proliferate in the xenograft model. In other words, colon cancer progression is only possible when cancer cells repress the biogenesis and functional activity of mitochondria.

Experimental procedures

Cell cultures and treatments. Human colorectal carcinoma HCT116 cells were grown in McCoy's 5A media supplemented with 10% fetal bovine serum. Twenty four h after seeding the cells they were left untreated (M-type) or treated with 6 μ M oligomycin (G-type) or 10mM 2-DG (SM-type) for 48h. On the day of the experiment the culture medium was replaced without the addition of any drug and the cells used (~ 60% confluence) for experiments. Where indicated the cells were incubated with 10 μ M 5-FU for 48h, or 1 mM DCA for 24h.

Protein electrophoresis and Western blot analysis. Cells were resuspended in lysis buffer (25mM Hepes, 2,5mM EDTA, 0, 1% Triton X-100, 1mM PMSF and 5 μ g/ml leupeptin). Cellular lysates were clarified by centrifugation at 11,000 x g for 15 min and the supernatants fractionated on SDS-PAGE and then transferred onto PVDF membranes for immunoblot analysis (Immobilon-P, Millipore). The protein concentration determined with the Bradford reagent (Bio-Rad protein assay). The primary monoclonal antibodies used were: anti-Hsp60 (heat-shock protein 60) (Stressgene SPA-807, 1:2,000), anti-GAPDH (Abcam, 1:20,000) and anti-tubulin (Sigma, 1:5,000). The polyclonal rabbit anti- β -F1-ATPase (1:15,000) (Cuezva et al., 2002) was also used. Peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgGs (Nordic Immunology, 1: 3,000) were used as secondary antibodies. The blots were developed using the ECL reagent.

Electron microscopy. For ultrastructural studies, M-, SM- and G-type cells treated or not with DCA were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1M Sörensen phosphate buffer pH 7.4 for 2h at room temperature. Cells were scraped from the plate, centrifuged at 3000 \times g for 5 min and the washed pellet post-fixed with 1% OsO₄ and 1% K₃Fe(CN)₆ for 1h. Samples were dehydrated with ethanol and embedded in Epon (TAAB 812 resin, TAAB Laboratories Equipment Limited) according to standard procedures. Ultrathin sections were collected on collodion-carbon coated copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined at 80 kV in a Jeol 1010 electron microscope. Tumors derived in mice from M-type (AT-M), SM-type (AT-SM) and G-type (AT-G) cells were also processed for electron microscopy analysis. The determination of the relative cristae length was carried out in

digital images by determining the length of cristae relative to the mitochondrial transversal section (width) of each organelle. The relative matrix density was determined by the ratio of the mean grey intensity in mitochondria relative to that of the cytoplasm. For processing of digital images the Image J software package was used.

Aerobic glycolysis and cellular respiration. For the determination of the rates of aerobic glycolysis, 0.1 ml aliquots of the culture media were collected and used for the enzymatic determination of lactate. For respiratory measurements, $1-2 \times 10^6$ cells were resuspended in 200 μ l of respiratory medium (225mM sucrose, 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM H_2KPO_4 , 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris HCl pH 7, and 0.05% BSA) and the rates of oxygen consumption determined at 30° C in a Clark-type electrode (Valcarce et al., 1988). The rates of respiration were assessed using 10 mM succinate as respiratory substrate in the presence and absence of 5 μ M oligomycin and/or 2 μ M FCCP.

Cell cycle, cell death and cellular proliferation assays. The cells were treated as indicated, harvested and fixed in 70% ice-cold ethanol for at least 12 h at 4°C. Afterwards, cells were treated with RNase (100 μ g/ml) for 30 min at 37°C. The ploidy determination of the cells was estimated by flow cytometric analysis after staining of DNA with propidium iodide (50 μ g/ml). The DNA content per cell was then evaluated in a FACScan (Becton-Dickinson). For computer analysis only the signals from single cells were considered (10,000 cells/assay). Cellular proliferation was estimated by the determination of cell number, protein content and the analysis of the cell cycle. For the determination of cell number a 20 μ l aliquot of cell suspension was stained (1:1) with a 0.5% trypan blue solution. Cells able to exclude the dye were counted in a hemocytometer. Population doubling was calculated using the formula ($\log_2 (C_H/C_S)$), where C_H represents the number of cells harvest and C_S represents the number of cells seeded.

Determination of reactive oxygen species. The intracellular production of H_2O_2 was monitored using the oxidation-sensitive probe DCFH₂-DA (Molecular Probes). Approximately, 5×10^5 cells were resuspended in 300 μ l of PBS (phosphate-buffered saline) and incubated 30 min at 37° C with 5 μ M DCFH₂-DA (Santamaria et al., 2006). Propidium iodide was added to detect dead cells that were excluded from the analysis (1 μ g/ml). The

cellular fluorescence intensity was measured using a FACScan flow cytometer. For each analysis 10,000 events were recorded.

In vivo tumorigenesis and treatments. Approximately, 10^7 HCT116 cells of the M-type, G-type and SM-type were injected into the flank of 6-week-old nude male mice (National Cancer Institute, Frederick, Maryland). Tumor size was determined using a standard caliper and its volume calculated using the formula $(\text{width}^2 \times \text{length}) \times 0.52$, where width represents the shortest tumor dimension. Following the ethical criteria established by our Institutional Review Board the animals were sacrificed when the tumor volume reached $\sim 3,000 \text{ mm}^3$. In any case, animals were followed during a maximum period of 50 days. Tumors were excised and processed for gene expression analysis, electron microscopy and western blot analysis. For treatment studies, nude mice were injected into the right flank with 10^7 G-type HCT116 cells. Twenty days after tumor induction, when tumors reached $\sim 1,000 \text{ mm}^3$ of volume, the animals were randomly allocated into three different groups for daily intraperitoneal injections (100 μl) with an activator of mitochondrial metabolism (1 mM DCA), a conventional treatment for colon cancer (0.5 mM 5-FU) or 0.9 % NaCl as a control group. All treatments were performed for six consecutive days at which time the animals were weighted and sacrificed and the tumors extracted.

Gene array hybridization and analysis. Three independent samples were processed for each condition studied in cells (M- and G-type) and tumors (AT-M and AT-G). RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Quiagen). The cRNA was prepared and labeled (Progenika, Derio, Spain). Samples were hybridized to Human Genome U133Plus2.0 array. Following hybridization, the gene chips were analyzed with Gene Chip Operating Software (GCOS 1.4 Affymetrix®, Santa Clara, CA) following the manufacturer's instructions. Dispersion graphs verified the normal distribution obtained in gene expression analysis. Expression data were imported into BRB-ArrayTools version 3.5.0-Patch for transformation, normalization and analysis (Progenika, Derio, Spain). The Partek Genomics Suite v7.3.1 software was used to normalize the data. Differentially expressed genes (up/down-regulated) were selected to generate the work list by comparing to the mean value of M-type cells or AT-M tumor samples. Raw expression ratio data sets were filtered using

the Cluster and TreeView software. Differentially expressed tags between M- and G-cells and between AT-M and AT-G tumors were selected based on qualitative change (increase or decrease), p-value, fold change and statistical significance ($p < 0.05$). The multiple correction tests of Bonferroni and Benjamini and Hochberg (or FDR) were applied to the data. Pathways analysis was performed using GenMAPP and MAPPFinder version 2.0 beta (Gladstone Institutes, San Francisco, USA). All the genes in the chip were included in order to identify relevant differences ($p < 0.05$) in pathways activity between M- and G-cells and between AT-M and AT-G tumors. The lists of differentially expressed genes were analyzed for relative enrichment within GO and GeneGo cellular processes, metabolic pathways, diseases, or canonical pathways maps using the information provided by Affymetrix.

Quantitative RT-PCR analysis. Total RNA samples were quantified with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer. Reverse transcription (RT) reactions were performed using 1 μ g of total RNA and the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with random primers, following manufacturer's instructions. Thermal conditions included a first step of 10 minutes at 25°C, a second step of 120 minutes at 37°C and a final step of 5 seconds at 85 °C. Primers were designed with Probe Finder Software (Roche Applied Science). All the primers (see Table S3 in supplementary material) were blasted to prevent cross-amplifications. Real-time PCR was performed using Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reactions were performed in triplicates for each sample-gene pair in a total volume of 10 μ l (384-well plates) with a starting cDNA amount equivalent to 5 ng of the original RNA sample, in the presence of 250 nM forward and reverse primers. Experiments were carried in a 7900HT instrument (Applied Biosystems) with the following parameters: initial denaturation of 10' x 95° C followed by 40 two-step cycles (15'' x 95°C + 1' x 60 °C). Ct values were analyzed with Genex software (MultiD Analyses AB, Sweden).

Statistical analysis. The results shown are the means \pm SEM. Statistical analysis was performed by Student's t test. To evaluate the linear association between different variables, the Pearson's correlation coefficient and the p-value (p) were calculated using the SPSS 13.0 software package. Survival curves were derived from Kaplan-Meier estimates and compared by log-rank test. Statistical tests were two-sided at the 5 % level of significance.

Acknowledgements

We are grateful to J. Palacín, M.T. Rejas and F. Carrasco (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) for their support in nude mice, electron microscopy and quantitative polymerase chain reaction studies, respectively. MSA was the recipient of a pre-doctoral fellowship from Ministerio de Sanidad y Consumo (PI041255 grant). This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2007-65253), the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del ISCIII, Madrid and Comunidad de Madrid (S-GEN-0269), Spain. The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

References

- Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D., Fernández, P. L., Roncador, G., Fernández-Malavé, E., Chamorro, M., and Cuezva, J. M. (2009). Cancer Abolishes the Tissue Type-Specific Differences in the Phenotype of Energetic Metabolism. *Transl Oncol.* (In press).
- Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S. Y., Klein-Szanto, A., Vijayasarathy, C., and Avadhani, N. G. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *Embo J* 20, 1910-1920.
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., *et al.* (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 37-51.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66, 717-749.
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD(+) metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Cao, W., Yacoub, S., Shiverick, K. T., Namiki, K., Sakai, Y., Porvasnik, S., Urbanek, C., and Rosser, C. J. (2008). Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 68, 1223-1231.
- Carmona, M. C., Iglesias, R., Obregon, M. J., Darlington, G. J., Villarroya, F., and Giralt, M. (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277, 21489-21498.
- Cuezva, J. M., Chen, G., Alonso, A. M., Isidoro, A., Misek, D. E., Hanash, S. M., and Beer, D. G. (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25, 1157-1163.
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J. C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62, 6674-6681.
- Cuezva, J. M., Ortega, A. D., Willers, I., Sánchez-Cenizo, L., Aldea, M., and Sánchez-Aragó, M. (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L. K., Ricart, J., López de Heredia, M., Di Liegro, C. M., and Izquierdo, J. M. (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29, 365-377.
- Cuezva, J. M., Sanchez-Arago, M., Sala, S., Blanco-Rivero, A., and Ortega, A. D. (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39, 259-265.

Chiu, C. H., Lin, W. D., Huang, S. Y., and Lee, Y. H. (2004). Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* 18, 1970-1975.

Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.

de Heredia, M. L., Izquierdo, J. M., and Cuezva, J. M. (2000). A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 275, 7430-7437.

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.

Dey, R., and Moraes, C. T. (2000). Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275, 7087-7094.

Fang, J. S., Gillies, R. D., and Gatenby, R. A. (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 18, 330-337.

Fantin, V. R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425-434.

Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.

Frezza, C., and Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol* 19, 4-11.

Funes, J. M., Quintero, M., Henderson, S., Martinez, D., Qureshi, U., Westwood, C., Clements, M. O., Bourboulia, D., Pedley, R. B., Moncada, S., and Boshoff, C. (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6223-6228.

Garber, K. (2006). Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312, 1158-1159.

Giraud, M. F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta* 1555, 174-180.

Goyon, V., Fronzes, R., Salin, B., di-Rago, J. P., Velours, J., and Brethes, D. (2008). Yeast cells depleted in Atp14p fail to assemble Atp6p within the ATP synthase and exhibit altered

mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 283, 9749-9758.

Gross, A., Pilcher, K., Blachly-Dyson, E., Basso, E., Jockel, J., Bassik, M. C., Korsmeyer, S. J., and Forte, M. (2000). Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol Cell Biol* 20, 3125-3136.

Harris, M. H., Vander Heiden, M. G., Kron, S. J., and Thompson, C. B. (2000). Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20, 3590-3596.

Hervouet, E., Demont, J., Pecina, P., Vojtiskova, A., Houstek, J., Simonnet, H., and Godinot, C. (2005). A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 26, 531-539.

Hoek, K., Rimm, D. L., Williams, K. R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H. M., Berger, A. J., Cheng, E., Trombetta, E. S., *et al.* (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64, 5270-5282.

Ishikawa, F., Akimoto, T., Yamamoto, H., Araki, Y., Yoshie, T., Mori, K., Hayashi, H., Nose, K., and Shibamura, M. (2009). Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem.* (In Press).

Isidoro, A., Casado, E., Redondo, A., Acebo, P., Espinosa, E., Alonso, A. M., Cejas, P., Hardisson, D., Fresno Vara, J. A., Belda-Iniesta, C., *et al.* (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26, 2095-2104.

Izquierdo, J. M., and Cuezva, J. M. (1997). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17, 5255-5268.

Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G., and Cuezva, J. M. (1995). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270, 10342-10350.

Jaattela, M. (2004). Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23, 2746-2756.

Jones, R. G., and Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.

Kim, J. Y., Kim, Y. H., Chang, I., Kim, S., Pak, Y. K., Oh, B. H., Yagita, H., Jung, Y. K., Oh, Y. J., and Lee, M. S. (2002). Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 3139-3148.

Kiss-Toth, E., Bagstaff, S. M., Sung, H. Y., Jozsa, V., Dempsey, C., Caunt, J. C., Oxley, K. M., Wyllie, D. H., Polgar, T., Harte, M., *et al.* (2004). Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 279, 42703-42708.

- Lin, P. C., Lin, J. K., Yang, S. H., Wang, H. S., Li, A. F., and Chang, S. C. (2008). Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis* 23, 1223-1232.
- Lithgow, T., Cuezva, J. M., and Silver, P. A. (1997). Highways for protein delivery to the mitochondria. *Trends Biochem Sci* 22, 110-113.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A. D., Berrendero, J. R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J. M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67, 9013-9017.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., and Reed, J. C. (1998). The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1, 327-336.
- McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N. D., Wu, H., Schell, M. J., Tsang, T. M., Teahan, O., *et al.* (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem* 283, 22700-22708.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12356-12358.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., *et al.* (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112-123.
- Park, S. Y., Chang, I., Kim, J. Y., Kang, S. W., Park, S. H., Singh, K., and Lee, M. S. (2004). Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279, 7512-7520.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* 21, 221-230.
- Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., and Capaldi, R. A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64, 985-993.
- Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I., and Cuezva, J. M. (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27, 925-935.

- Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88, 611-638.
- Shin, Y. K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E., Hong, S. H., Jung, M. S., Lim, S. J., and Park, J. G. (2005). Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 65, 3162-3170.
- Spiegelman, B. M. (2007). Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 287, 60-63; discussion 63-69.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R., and Kuhlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *Embo J* 27, 1154-1160.
- Thierbach, R., Schulz, T. J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., von Kleist-Retzow, J. C., Wiesner, R. J., Magnuson, M. A., Puccio, H., *et al.* (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14, 3857-3864.
- Tomiyama, A., Serizawa, S., Tachibana, K., Sakurada, K., Samejima, H., Kuchino, Y., and Kitanaka, C. (2006). Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 98, 1462-1473.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J. J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P. G., Pequignot, M. O., Casares, N., Lazar, V., *et al.* (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *Embo J* 23, 4679-4689.
- Valcarce, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J., and Cuezva, J. M. (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263, 7767-7775.
- Vaughn, A. E., and Deshmukh, M. (2008). Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10, 1477-1483.
- Warburg, O. (1966). Annual meeting of Nobelists at Lindau, Germany. English Edition by Dean Burk, Natinal Cancer Institute, Bethesda, MD.
- Wong, J. Y., Huggins, G. S., Debidda, M., Munshi, N. C., and De Vivo, I. (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* 109, 394-402.
- Wu, H., Kanatous, S. B., Thurmond, F. A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.
- Xia, Y., Buja, L. M., Scarpulla, R. C., and McMillin, J. B. (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11399-11404.

Yang, J., Bielenberg, D. R., Rodig, S. J., Doiron, R., Clifton, M. C., Kung, A. L., Strong, R. K., Zurakowski, D., and Moses, M. A. (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3913-3918.

Yao, J., Weremowicz, S., Feng, B., Gentleman, R. C., Marks, J. R., Gelman, R., Brennan, C., and Polyak, K. (2006). Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res* *66*, 4065-4078.

Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., and Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo J* *21*, 4411-4419.

Figure legends

Figure 1. The bioenergetic signature of HCT116 colon cancer cells. (A) Representative *western blots* of the expression of β -F1-ATPase, Hsp 60, GAPDH, and tubulin in three different preparations (lanes 1-3) of OL-treated (G), 2DG-treated (SM), and non-treated (M) HCT116 cells. The histograms show the calculated bioenergetic signature (β -F1/GAPDH ratio) and β -F1/Hsp60 ratio. (B) Electron microscopy analysis of G-cells, M-cells and SM-cells at low (upper panels) and high (lower panels) resolution reveal large ultrastructural differences in the mitochondria of G-cells when compared to M- or SM-cells. (C) The histograms show the quantification of the relative cristae length and matrix density of mitochondria. (D) Rates of aerobic glycolysis in G-, M- and SM-cells. (E) The rates of OL-sensitive respiration were determined after the addition of 5 μ M OL. Plot in (F) illustrates the inverse relationship existing between the activity of oxidative phosphorylation and the rates of aerobic glycolysis. * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ when compared to M cells.

Figure 2. An enforced glycolysis encourages *in vivo* tumor growth. (A) 2DG-treated (SM), OL-treated (G) and non-treated (M) cells were cultured for various days for the determination of population doubling. (B) SM-, G- and M-cells were injected into the right flank of nude mice. An enforced glycolytic phenotype accelerates the increase in tumor volume (cm³). *, $p < 0.05$ when compared to M injected mice. (C) Kaplan–Meier analysis shows the association of the bioenergetic phenotype of the cell with tumor progression. Log-rank significance is indicated in the plot. (D) SM-, G- and M-type cells were treated as indicated with 10 μ M 5-FU. FACS analysis of the percentage of dead cells after 48h of treatment. (E) Fold induction in the generated H₂O₂ after 5-FU treatment as determined by FACS. * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ when compared to M-cells.

Figure 3. Repression of mitochondrial biogenesis in G-cells. Three different samples of OL-treated (G1-G3) and non-treated (M1-M3) cells were processed for gene expression analysis using the Human Genome Plus 2.0 array (Affymetrix). (A) The dendrogram shows the large differences that exist between M-(red) and G-(blue) cells as assessed by 3,430 genes found differentially expressed ($p < 0.05$, see Table S1). The Kegg Pathways (B) and Biological Process (C) most significantly affected in G-cells when compared to M-cells

is shown. The percentage of identified genes within a particular pathway and process is indicated. P-values for Partek analysis and Benjamini multiple correction test are also listed. **(D)** The heatmap illustrates the transcriptomic repression of mitochondrial functions by clustering of M- (n=3) and G-samples (n=3) in two different groups using the 369 genes related with mitochondrial function that are differentially expressed. Gene expression scores are shown according to a color scale: red, high; green, low. **(E)** Quantitative RT-PCR validation of the microarray analysis in M- (red bars) and G- (blue bars) cells. Relative expression levels were normalized using Normfinder algorithm criteria to the actin, ND6 and PGLS content determined by qRT-PCR. *, $p < 0.001$ when compared to M cells.

Figure 4. Tumors derived from HCT116 colon cancer cells have the same mitochondrial phenotype. OL-treated (G), 2DG-treated (SM) and non-treated (M) cells were injected into nude mice and the developed tumors analyzed by *western blot* **(A)**, qRT-PCR **(B)** and electron microscopy **(C)**. **(A)** Representative *western blots* of the expression of β -F1-ATPase, Hsp60 and GAPDH in three different tumor preparations (AT) derived from M- (AT-M), G- (AT-G) and SM- (AT-SM) implanted cells. The histograms show the calculated β -F1/Hsp60 ratio and bioenergetic signature (β -F1/GAPDH ratio) in AT-SM, AT-M and AT-G samples and in the parental G- and M-cells. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.001$ and when compared to M-cells. n.s., non-significant when compared to G-cells. **(B)** Tumors derived from implanted M- (AT-M, closed bars) and G- (AT-G, open bars) cells were processed for quantitative RT-PCR. Relative expression levels were normalized using Normfinder algorithm criteria to the BNIP3 content determined by qRT-PCR. *, $p < 0.001$ when compared to M cells. **(C)** Ultrathin sections of AT-G, AT-M- and AT-SM tumors processed for electron microscopy revealed the presence of rounded mitochondria that lacked cristae very much resembling the organelle observed in G-cells.

Figure 5. The reversible nature of the metabolic phenotype. **(A)** 2DG-treated (SM) and OL-treated (G) cells were maintained in culture in the absence of 2DG or OL for 12 days for the determination of the rates of aerobic glycolysis. The mean rate of aerobic glycolysis in M-cells is represented by a dotted line with upper and lower range limits represented by broken lines. **(B)** Analysis of the bioenergetic signature (β F1/GAPDH ratio) in washed SM-

and G-cells. * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ when compared to parental cells, respectively. **(C)** Rates of aerobic glycolysis after 24h treatment with 10mM DCA. The rates of aerobic glycolysis in M-cells is included for comparison. **(D)** Electron microscopy analysis of non-treated and DCA-treated (G+DCA) G-cells reveal that DCA treatment triggers the appearance of infolds of the inner membrane (cristae) and an increase in matrix density. **(E)** Relative cristae length and matrix density of mitochondria in non-treated and DCA-treated G-cells. * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ when compared to non-treated G-cells. **(F)** Cellular proliferation is after 10mM DCA treatment to G-cells. *, $p < 0.05$ when compared to non-treated G-cells. **(G)** OL-treated (G) cells (10^7 cells per animal) were injected into nude mice and allowed to develop tumors until reaching $\sim 1,000 \text{ mm}^3$ of size (T.I, hatched bar). At the time animals received daily injections of 0.5 mM 5-FU (open bar) or 1mM DCA (grey bar) during six consecutive days. A 0.9 % NaCl-treated group (closed bar) was also included for comparison. The tumor volume is presented normalized to its volume before initiation of the treatments. * and #, $p < 0.05$ when compared to T.I and NaCl-treated mice, respectively. Representative tumors derived from control (0.9 % NaCl-treated) and treated mice are shown.

Protein Name	Gene Symbol	Fold Change	FDR P-value	Bonferroni P-value	Activity / Function
Up-regulated in G-type cells					
Lipocalin 2	LCN2	7,47	5,93E-04	0,00098	Iron transport /endocytosis
Ribosomal protein L37	RPL37	1,79	5,93E-04	0,00119	Protein synthesis
Uridine phosphorylase 1	UPP1	8,62	1,32E-03	0,00644	Nucleotide metabolism
Tribbles homolog 3	TRIB3	4,84	1,32E-03	0,00761	Cell cycle
Chromosome 6 open reading frame 48	C6orf48	2,26	1,32E-03	0,01114	Iron transport
Kallikrein-related peptidase 6	KLK6	1,70	1,32E-03	0,01141	Protein degradation
Transaldolase 1	TALDO1	1,67	1,32E-03	0,01332	Pentose phosphate pathway
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	5,34	1,32E-03	0,01464	Protooncogen
Serine/threonine kinase 24	STK24	1,42	1,32E-03	0,01559	Signal transduction
Chloride intracellular channel 4	CLIC4	1,77	1,43E-03	0,01929	Cellular homeostasis
Integrin, beta 1	ITGB1	1,49	1,43E-03	0,02003	Vascular development
6-phosphogluconolactonase	PGLS	1,69	1,46E-03	0,02189	Pentose phosphate pathway
Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	2,54	1,79E-03	0,03044	Amino acid synthesis (Ser)
Cystatin A (stefin A)	CSTA	4,34	1,79E-03	0,03341	Protein degradation
Chromosome 19 open reading frame 33	C19orf33	2,72	2,14E-03	0,04271	Tumorigenesis
EH domain binding protein 1	EHBP1	1,53	2,36E-03	0,05102	Endocytosis/ cytoskeleton organization
Plasminogen activator, urokinase	PLAU	5,27	2,36E-03	0,05420	Extracellular matrix degradation
Asparagine synthetase	ASNS	4,44	2,58E-03	0,06789	Cell cycle- G1 progression
SH3-domain kinase binding protein 1	SH3KBP1	2,44	2,58E-03	0,07473	Endocytosis/EGFR signalling
Carboxypeptidase A4	CPA4	1,62	2,58E-03	0,07482	Cell proliferation/differentiation
Calbindin 2, 29kDa (calretinin)	CALB2	3,54	3,04E-03	0,12476	Intracellular Ca ²⁺ regulation
Neuropilin 1	NRP1	10,11	3,06E-03	0,13754	Vascular development
AXL receptor tyrosine kinase	AXL	3,51	3,22E-03	0,15295	Oncogen
Sestrin 2	SESN2	4,08	3,22E-03	0,15450	Oxidative stress response

Down-Regulated in G-type cells					
	FKBP5	-2,19	1,32E-03	0,00729	Protein folding / Ca ²⁺ signaling
	TCF7L1	-1,67	1,32E-03	0,01584	Transcription factor/ Wnt signalling
	SSFA2	-2,57	1,61E-03	0,02577	Integrin receptor
	FOS	-7,84	2,36E-03	0,05192	Mitochondrial biogenesis
	CFL2	-2,09	2,58E-03	0,06760	Actin-filament dynamics
	ATP5J2	-1,70	2,58E-03	0,07060	OXPHOS
	ATP5G3	-1,64	2,58E-03	0,07141	OXPHOS
	KITLG	-3,28	2,66E-03	0,07975	Stem cell factor/differentiation inhibitor
	DHRS2	-2,00	2,68E-03	0,08312	Cell cycle
	CRYM	-2,01	2,68E-03	0,09104	T3 binding protein
	SYTL2	-4,73	2,69E-03	0,09683	Ca ²⁺ sensor/ protein trafficking
	FK506 binding protein 5				
	Transcription factor 7-like 1				
	Sperm specific antigen 2				
	v-fos FBJ viral oncogene				
	Cofilin 2 (muscle)				
	Mitochondrial ATP synthase, F0-subunit F2				
	Mitochondrial ATP synthase, F0-subunit C3				
	KIT ligand				
	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2				
	Crystallin, mu				
	Synaptotagmin-like 2				

Table 1. Genes differentially expressed in M- and G-type cells. The table summarizes a list of relevant genes found up- or down-regulated in G-cells when compared to M-cells. Inclusion of the genes in this list follows statistical significance by the stringent multiple correction tests of FDR and Bonferroni. The protein name, gene symbol, fold change value and the main cellular activity is indicated.

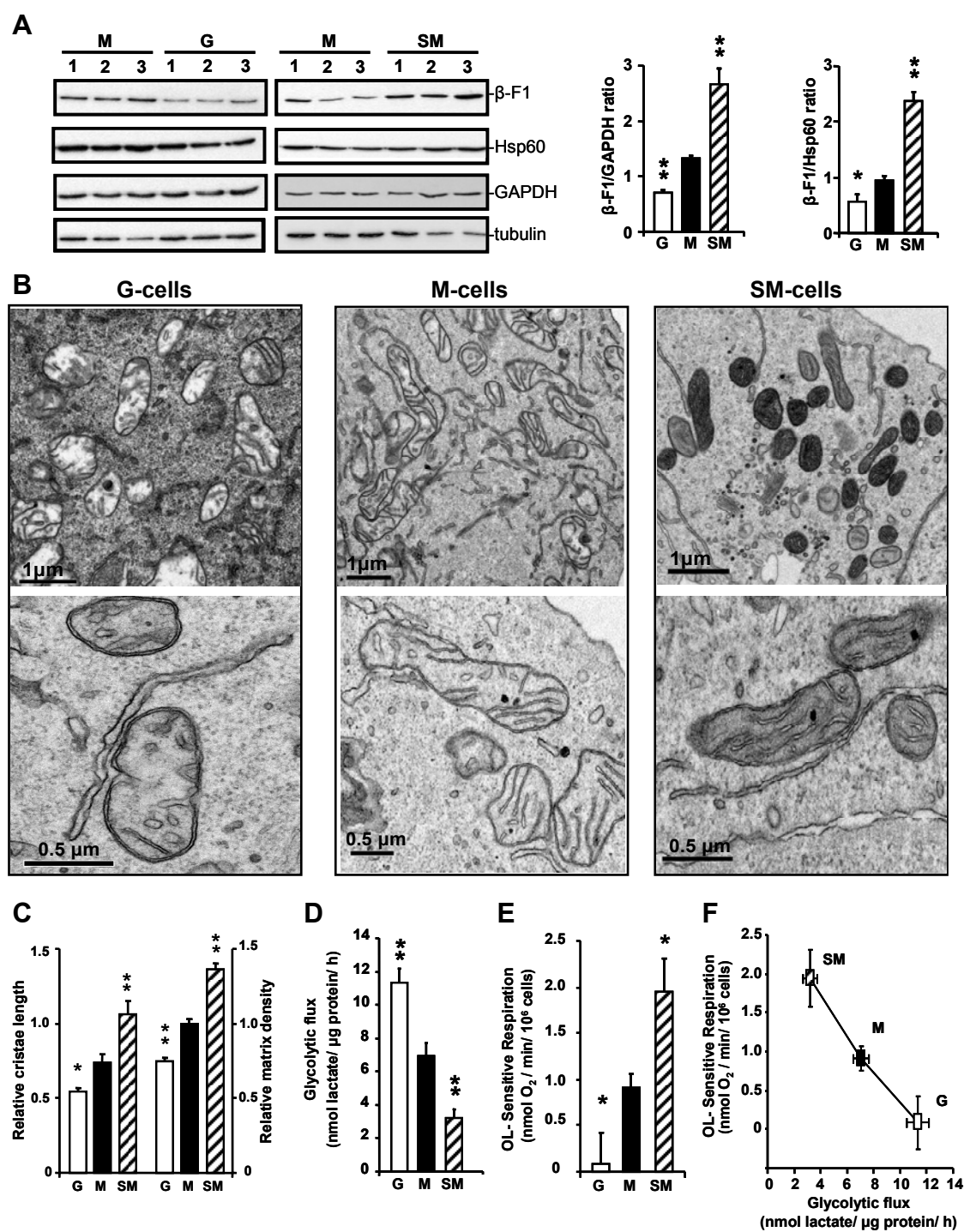


Figure 1

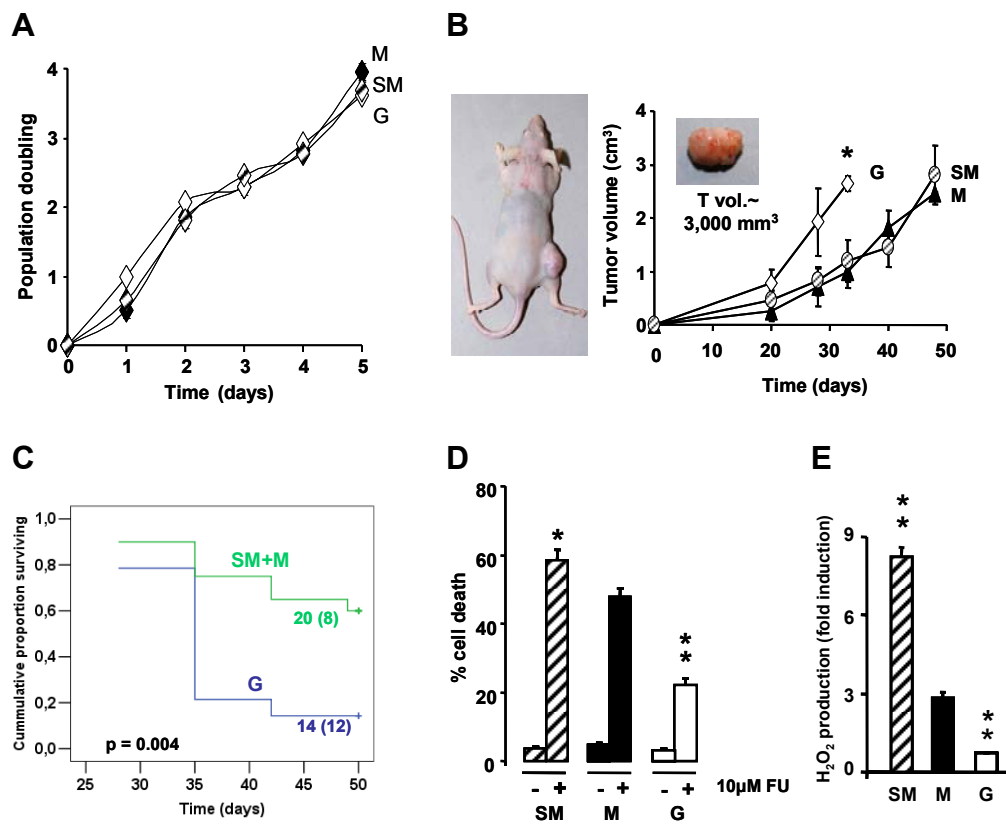


Figure 2

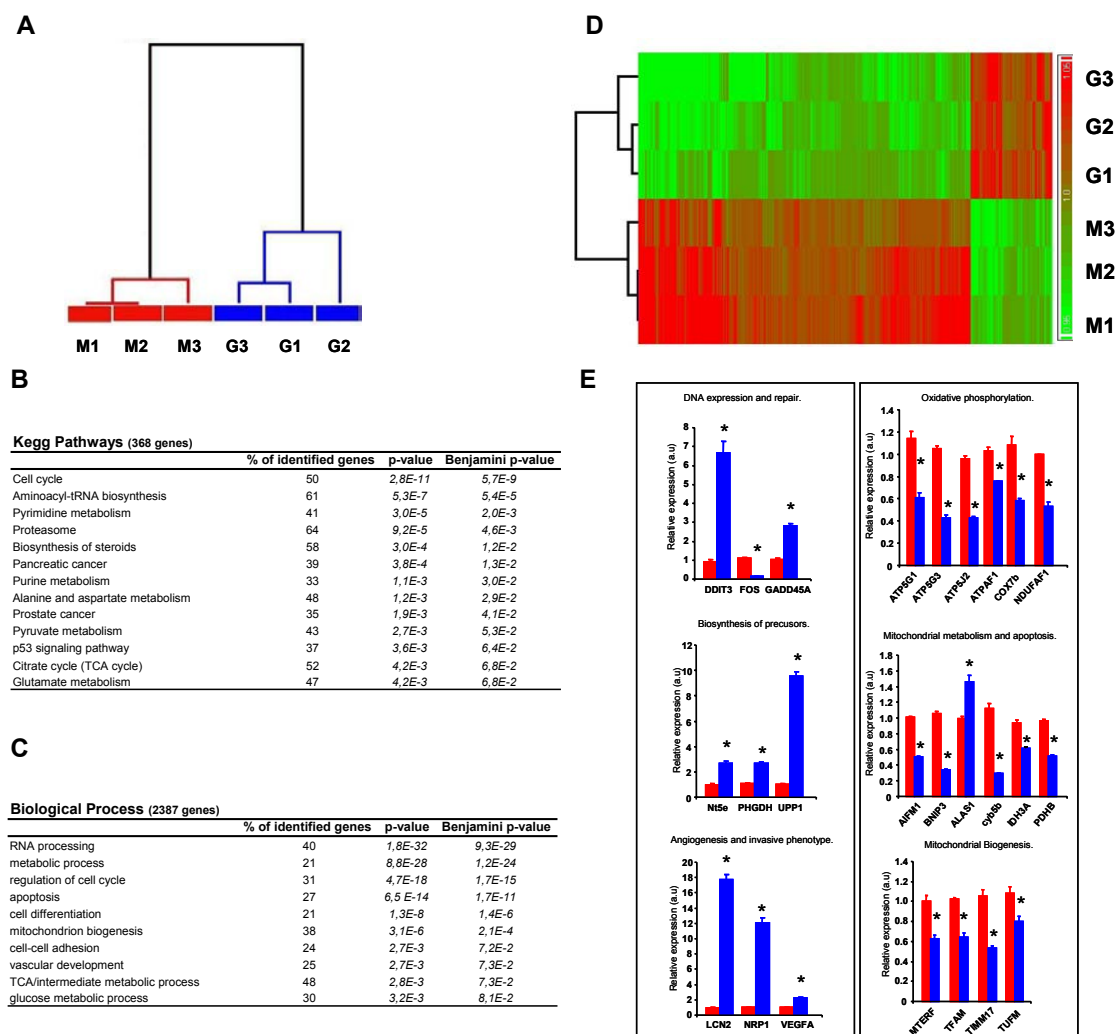


Figure 3

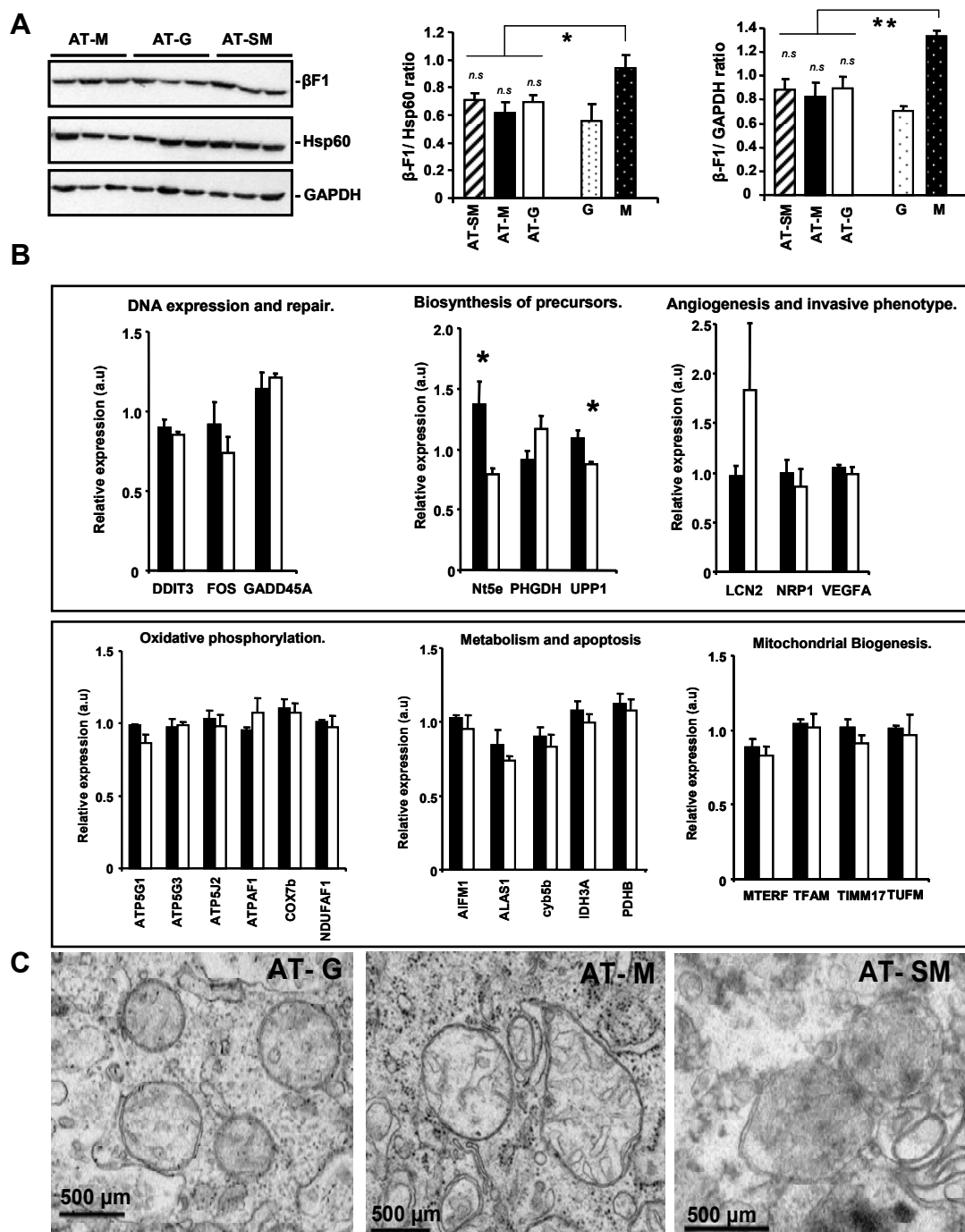


Figure 4

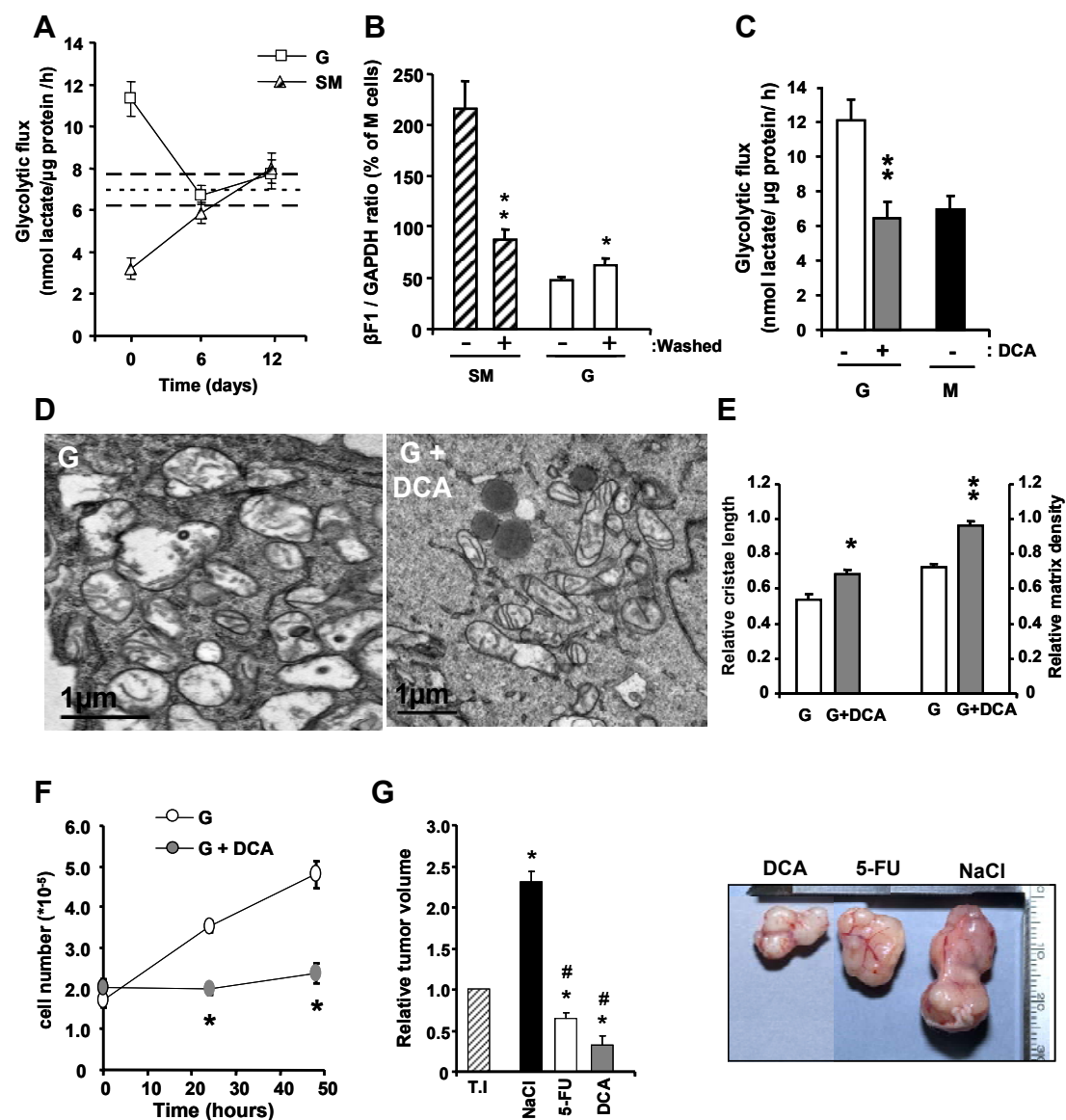


Figure 5